

PERDA PREMATURA DE VITALIDADE CELULAR EM BAGAS  
DE *Vitis labrusca* L.

**LUAN BARITIELLO DA SILVA BEZERRA**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
MARÇO– 2018

PERDA PREMATURA DE VITALIDADE CELULAR EM BAGAS  
DE *Vitis labrusca* L.

**LUAN BARITIELLO DA SILVA BEZERRA**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestrado em Produção Vegetal

Orientador: Prof. Ricardo Enrique Bressan-Smith

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
MARÇO– 2018

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCH / UENF

075/2018

B276 Bezerra, Luan Baritiello da Silva.

Perda prematura de vitalidade celular em bagas de *Vitis labrusca* L. /  
Luan Baritiello da Silva Bezerra. – Campos dos Goytacazes, RJ, 2018.

57 f. : il.

Bibliografia: 38 – 47.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual  
do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias  
Agropecuárias, 2018.

Orientador: Ricardo Enrique Bressan-Smith.

1. Uva. 2. Amadurecimento. 3. Vitalidade Celular. 4. Bioquímica  
Celular. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II.  
Título.

CDD – 634.8

PERDA PREMATURA DE VITALIDADE CELULAR EM BAGAS  
DE *Vitis labrusca* L.

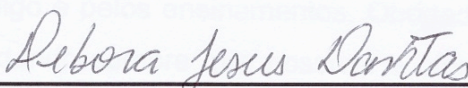
**LUAN BARITIELLO DA SILVA BEZERRA**

AGRADECIMENTOS

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestrado em Produção Vegetal

Aprovada em 28 de março de 2018

Comissão Examinadora



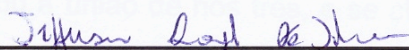
---

Prof<sup>ª</sup>. Debora Jesus Dantas (D.Sc., Fisiologia Vegetal) – UFRSA



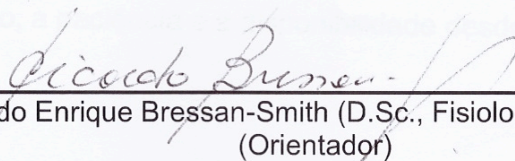
---

Leandro Hespanhol Viana (D.Sc., Produção Vegetal) – UENF



---

Jefferson Rangel da Silva (D.Sc., Produção Vegetal) – UENF



---

Prof. Ricardo Enrique Bressan-Smith (D.Sc., Fisiologia Vegetal) - UENF  
(Orientador)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e ao Laboratório de Fisiologia Vegetal pela oportunidade de realização e conclusão deste curso e de mais uma etapa da minha vida acadêmica.

Gostaria de agradecer à equipe do laboratório do Setor de Fisiologia Vegetal da UENF, aos professores e, de maneira especial, ao meu orientador Ricardo Bressan-Smith pela confiança, conhecimento transmitido, pelo companheirismo e momentos bons que vivemos dentro e fora do laboratório.

Um agradecimento mais que especial a Debora Dantas por toda preocupação comigo e pelos ensinamentos. Obrigado por estar o tempo todo ao meu lado me ajudando sempre que possível e oferecendo ideias boas. Você é minha inspiração.

A Ivanice Borges e a Bruna, por se tornarem parte do meu dia-a-dia e minhas verdadeiras companheiras. A amizade de vocês foi e sempre será lembrada, assim como momentos bons e ruins que tivemos. Dos momentos difíceis ficou a união de nós três, e se cheguei até aqui, foi com muito esforço e colaboração de vocês.

Um agradecimento a Mickaela e ao Luan Cordeiro, que de alguma maneira estiveram envolvidos na realização deste trabalho. Agradeço o companheirismo, a paciência e a disponibilidade desde o início.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	v
ABSTRACT .....	vii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2.OBJETIVOS.....	4
3. REVISÃO DE LITERATURA .....	5
3.1 Breve histórico da videira.....	5
3.2 Aspectos morfológicos e ciclo da videira.....	6
3.3 Crescimento e desenvolvimento da baga.....	9
3.4 Vitalidade e morte celular da baga.....	12
3.5. Morte celular e espécies reativas de oxigênio.....	13
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1 Material vegetal.....	16
4.2. Estratégia experimental.....	16
4.2.1. Fase I: Desenvolvimento do mesocarpo durante a maturação da baga.....	17
4.2.1.1. Caracterização tecidual de morte celular.....	17
4.2.2. Fase II: Mudanças no metabolismo celular relacionadas à morte celular e à atividade antioxidante do mesocarpo durante a maturação da baga.....	18
4.2.2.1 Ensaio de atividade respiratória por MTT.....	18
4.2.2.2. Atividade da enzima catalase (CAT) .....	19
4.3. Análises qualitativas do desenvolvimento das bagas.....	20

4.3.1 Peso e sólidos solúveis totais.....	20
4.3.2. Deformabilidade das bagas.....	21
4.3.3. Diâmetro das bagas em desenvolvimento.....	21
4.4 Análises estatísticas.....	21
5. RESULTADOS.....	22
5.1 Vitalidade das células do mesocarpo.....	22
5.2. Atividade mitocondrial no mesocarpo.....	28
5.2.1. Ensaio colorimétrico com MTT.....	28
5.2.2. Atividade da enzima catalase (CAT).....	29
5.3. Caracterização do amadurecimento da baga.....	30
6. DISCUSSÃO.....	32
7. CONCLUSÃO.....	37
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

## RESUMO

BEZERRA, Luan Baritiello da Silva, MSc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Março de 2018. Perda Prematura de Vitalidade Celular em Bagas de *Vitis labrusca* L. Orientador: Ricardo Enrique Bressan-Smith.

A perda de vitalidade celular no mesocarpo de bagas de uva ocorre, geralmente, no final do ciclo de desenvolvimento. Entretanto, a intensidade e o período de ocorrência na baga são dependentes da variedade avaliada. Adicionalmente, a presença de espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas, principalmente nas mitocôndrias, é capaz de causar danos às células e participar da morte celular. Neste trabalho, bagas de Niagara Rosada (*Vitis labrusca* L.) foram utilizadas como modelo para avaliar o padrão de perda de vitalidade das células do mesocarpo ao longo do ciclo de desenvolvimento. Bagas foram estudadas a partir dos 30 até 86 dias após a antese (DAA) e avaliadas em termos de vitalidade celular pelo uso do corante fluorescente (FDA), e avaliadas bioquimicamente pela redução do reagente MTT. Além disso, foi analisada a atividade da enzima catalase no mesocarpo das bagas e avaliadas as características quantitativas e qualitativas da baga, como o diâmetro, a matéria fresca, a deformabilidade e os sólidos solúveis totais. Os resultados das análises de vitalidade celular do mesocarpo comprovaram que a perda de integridade das membranas celulares foi intensificada no início do amadurecimento, ainda que a análise pelo MTT demonstrasse um elevado percentual de atividade mitocondrial no final



do amadurecimento. A atividade da enzima catalase apresentou um aumento no início do amadurecimento, seguida de uma redução no final do amadurecimento. No entanto, houve manutenção do tamanho e peso das bagas, e os sólidos solúveis totais aumentaram para valores considerados ótimos, mesmo quando estas atingiram elevada taxa de perda de vitalidade celular. Os resultados obtidos sugerem que bagas de Niagara Rosada tem perda celular precoce em relação às variedades de *Vitis* sp avaliadas até o momento.

Palavras-chave: uva, amadurecimento, vitalidade celular, bioquímica celular

## ABSTRACT

BEZERRA, Luan Baritiello da Silva, MSc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. March 2018. Premature Cellular Viability Loss in *Vitis labrusca* Berries. Advisor: Ricardo Enrique Bressan-Smith.

The loss of cell viability in grape berry mesocarp generally occurs at the end of the developmental cycle. However, the intensity and the period of occurrence is variety-dependent. In addition, the presence of reactive oxygen species (ROS) produced mainly in the mitochondria is capable of impairing cells and result in cell death. In this work, we evaluated the loss of viability in mesocarp cells throughout the developmental stages of Niagara Rosada berries (*Vitis labrusca* L.). Bisected Berries were studied from 30 to 86 days after anthesis (DAA) and evaluated in terms of the membrane integrity (cell viability) by using a vital stain (FDA), and evaluated biochemically by the reduction of MTT. In addition, the catalase activity was analyzed in the cell mesocarp as well as the quantitative and qualitative characteristics of the berry, such as the diameter, weight, deformability and total soluble solids. The analyzes of the cell viability of the mesocarp indicated the loss of cell membrane integrity, that was initiated just after the veraison, although the MTT analysis demonstrated a high percentage of mitochondrial activity at the end of maturation. The activity of the catalase enzyme increased at the veraison, followed by a reduction at the end of ripening. Interestingly, the size and weight of the berries were maintained, and the total soluble solids increased to values

considered optimal, even when they reached a high rate of loss of cell viability. The set of results suggest that the loss of cell viability in Niagara Rosada berries is premature in relation to the varieties of *Vitis* sp evaluated to date.

Key words: grape, maturation, cellular vitality, cellular biochemistry

## 1. INTRODUÇÃO

A morte celular é um evento comum da parte final do ciclo de desenvolvimento para órgãos e tecidos vegetais (Greenberg 1996; Thomas et al., 2009). Em bagas de uva, a intensidade e o período em que ocorre a morte celular parecem ser determinados por diferenças varietais (Tilbrook e Tyerman, 2008).

Em *Vitis vinifera*, a morte celular ocorre no final do amadurecimento da baga (Tilbrook e Tyerman, 2008; Fuentes et al., 2010). Nesse caso, há uma correlação com o início de um fenômeno denominado de murcha das bagas, comumente observado na variedade Shiraz (Tyerman, et al. 2012). No entanto, isso não significa que a morte celular provoque essa murcha, uma vez que há uma diferença marcante entre algumas variedades. Tilbrook e Tyerman (2008) durante seus estudos com as variedades Shiraz, Chardonnay e Thompson Seedless descobriram uma etapa significativa e importante até então não reconhecida no desenvolvimento da videira. Com uso de corantes indicadores, os autores observaram que o início da morte das células do mesocarpo começou 90-100 dias após o florescimento, exceto para Thompson Seedless, que não demonstrou perda de vitalidade mesmo no final do amadurecimento.

Nas variedades Chardonnay e Shiraz o efeito da alta temperatura foi testado com uso de um sistema constituído de placas de policarbonato que aumentam a temperatura ambiente em volta das videiras. Esse sistema foi suficiente para acelerar e intensificar a taxa de morte celular do mesocarpo

durante o amadurecimento para as duas variedades testadas (Bonada et al., 2013).

A perda de vitalidade das células do mesocarpo no final do amadurecimento, quando as bagas atingem o peso máximo, tem sido relatada em diversos estudos (Lang e Düring, 1991; Dreier et al., 1998; Sadras e McCarthy, 2007). Na fase *pós-veraison* de Syrah e Chardonnay, a morte celular atingiu cerca de 30% e 50% da área do mesocarpo, respectivamente (Fuentes et al., 2010). Lang e Düring (1991) sugeriram que a perda de integridade das células do mesocarpo é um acontecimento normal do desenvolvimento da baga. Isso explicaria a perda generalizada do conteúdo celular para o apoplasto, levando à perda da viabilidade celular, da firmeza e pressão de parede da célula.

Adicionalmente, a morte celular que, ocorre ao longo do desenvolvimento da baga pode estar relacionada com a presença de espécies reativas de oxigênio (EROs). Segundo Carvalho et al. (2015), as EROs atuam como moléculas sinalizadoras envolvidas nos processos de crescimento e desenvolvimento, respostas de defesa do patógeno, produção de hormônio do estresse, aclimação e morte celular programada.

A produção de EROs ocorre principalmente nas mitocôndrias, e, por isso, essas organelas desempenham um papel fundamental na manutenção de vida e morte de células de plantas (Diamond e McCabe 2011). Porém, o acúmulo de EROs pode prejudicar a integridade da membrana mitocondrial, resultando finalmente em disfunção mitocondrial irreversível (Moller, 2001), que se acredita ser uma das principais causas da morte celular em diversos organismos, incluindo frutos em amadurecimento (Qin, et al., 2009).

Quando a produção de EROs excede a capacidade antioxidante, isto pode levar a danos nas células e, em última análise, à morte celular pela toxicidade de EROs e / ou eventos de sinalização específicos ativados por EROs. Em uvas, Pilati et al., (2014) mostraram que o acúmulo de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e a modulação de enzimas responsáveis pela eliminação de espécies reativas de oxigênio aconteceram no início da maturação da baga.

Lerin (2016) evidenciou que a integridade das membranas celulares se manteve até os 58 dias após a antese em bagas de Niagara Rosada e uma perda de vitalidade de, aproximadamente, 82% durante o ciclo de desenvolvimento, desde o início do crescimento das bagas até atingirem o amadurecimento.

Diante desse cenário, a variedade Niagara Rosada (*Vitis labrusca* L.) parece apresentar uma predisposição à ocorrência de perda de vitalidade das células do mesocarpo a partir do *veraison*, percebida fisicamente pela mudança da consistência da polpa que se torna mais tenra e pouco crocante.

A partir do exposto, sugere-se no presente trabalho a hipótese que a morte celular detectada em bagas de Niagara Rosada seja prematura e está relacionada à perda de integridade das membranas celulares no mesocarpo e à presença de EROs provenientes da atividade mitocondrial, ainda que a qualidade do fruto se mantenha, em comparação às demais variedades já estudadas. Para isso, foi realizado um estudo da morte celular em escala temporal, ou seja, ao longo dos estádios de desenvolvimento do fruto, associado a análises bioquímicas e do metabolismo celular, uma vez que pouco se compreende em relação aos eventos que ocorrem ao longo do desenvolvimento das bagas dessa variedade.

## 2. OBJETIVO

- I. Este trabalho teve como objetivo comprovar se a perda de vitalidade celular no mesocarpo de bagas de Niagara Rosada ocorre de forma prematura.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Breve histórico da videira

O gênero *Vitis*, pertencente à família das Vitaceae, é composto por mais de 70 espécies, entre elas estão *Vitis vinifera*, *Vitis labrusca*, *Vitis riparia* e *Vitis rupestris*. Como no caso de muitas plantas, as espécies do gênero *Vitis* não estão muito bem definidas devido à extrema variação morfológica entre e dentro de populações de videiras selvagens (Currle et al.1983; Hardie, 2000; Mullins et al., 1992). As espécies que se destacam para o consumo “*in natura*” e elaboração de vinhos, sucos, entre outros, são a *Vitis vinifera* e *Vitis labrusca*. A primeira é originada na Eurásia, na região compreendida entre os Mares Negro e Cáspio, ao Sul do Cáucaso, e a segunda na América do Norte (Hardie, 2000; Miolo e Miele, 2003; Iland et al., 2011).

Os primeiros sinais da videira datam da era pré-histórica. O cultivo teria iniciado durante a era Neolítica (6000-5000 A.C) junto à costa leste do Mar Negro. No entanto, achados arqueológicos de sementes de uva indicam que a *Vitis vinífera* L., ou seu progenitor, *Vitis sylvestris*, foi distribuída pela Europa durante os períodos Atlântico ou Holocênico e Sub-boreal entre 7500 e 2500 anos atrás (Mullins et al.,1994). Segundo Camargo (1998), o centro de origem da videira foi, possivelmente, a atual Groenlândia.

A introdução da videira no Brasil, segundo relatos históricos, ocorreu em 1532, quando Martim Afonso de Souza registrou o transporte das videiras



portuguesas para a então Capitania de São Vicente, atual Estado de São Paulo. Desde então, e por introduções posteriores, a viticultura expandiu-se para outras regiões do país (Protas et al., 2002). Em 1933, no município de Louveira, em São Paulo surgia a variedade Niagara Rosada por mutação genética natural da variedade Niagara Branca (Maia, 2002). Esta foi criada a partir do cruzamento entre a variedade Concord e Cassady, em 1868, no condado de Niágara, em Nova Iorque, EUA (Camargo, 1994). No Brasil, a Niagara Rosada, rapidamente, predominou sobre a Niagara Branca (Sousa, 1996).

### 3.2. Aspectos morfológicos e ciclo da videira

A videira é considerada uma planta trepadeira, lenhosa de porte arbustivo (Mullins et al., 1992) perene e de folhas decíduas (Pommer, 2003). Morfológicamente, são caracterizadas pela ocorrência de gavinhas e inflorescências opostas às folhas (Mullins et al., 1994). As raízes são fasciculadas, podendo ser encontradas, na maior parte, dentro dos primeiros 60 a 150 cm de profundidade. No final do ciclo vegetativo, com a queda das folhas, as raízes são responsáveis pelo acúmulo de carboidratos, os quais servirão para o desenvolvimento inicial da planta no próximo ciclo (Moraes, 2003).

A parte aérea da planta é constituída de tronco e ramos, responsáveis pela sustentação dos frutos, do tipo baga (Hidalgo, 1993; Alvarenga, et al., 1998) e agrupados em cachos. Os frutos da videira, assim como as folhas, podem apresentar diferentes formas e tamanhos e ainda as folhas podem ter ou não pelos (Souza, 1996; Terra et al., 1997). Nos ramos, as folhas são de grande importância para a interceptação da luz, realização da fotossíntese, proteção dos frutos e produção de carboidratos. As folhas mais próximas do cacho são as que fornecem a maior parte dos açúcares necessários para o desenvolvimento do fruto, assim como, para o crescimento e metabolismo da videira de maneira geral (Candolfi-Vasconcellos et al., 1994; Jackson, 2008; Iland et al., 2011).

O cacho é composto por pedúnculo, ráquis, pedicelo e flores que quando fertilizadas se tornarão bagas (Figura 1). Em Niagara Rosada, as bagas são de cor rosado-avermelhada, peso médio de 5 a 6 gramas, forma ovalada, sucosa e com muita pruína e sabor doce foxado, muito apreciado pelo paladar brasileiro (Manica e Pommer, 2006). Estrutura do cacho, comprimento, largura e peso podem variar, dependendo da variedade e das práticas de manejo (Iland et al., 2011).

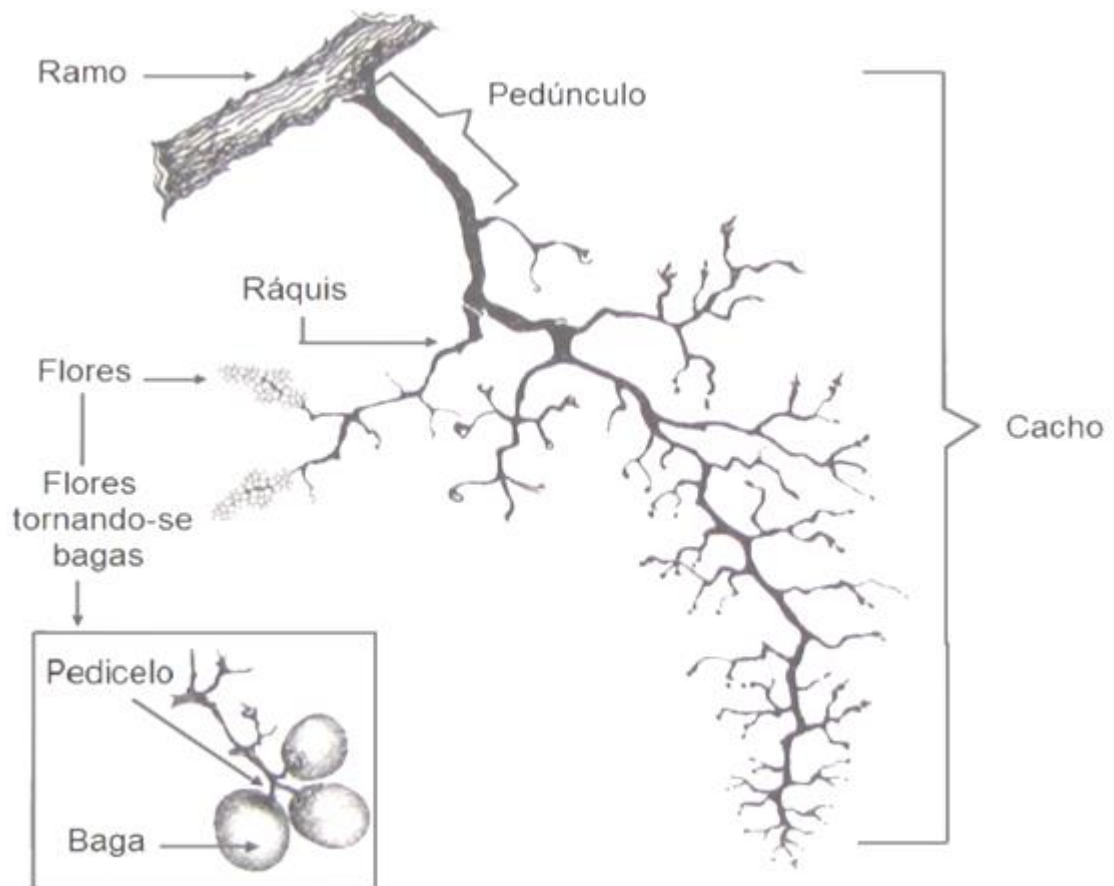


Figura 1. Esquema de composição do cacho. Fonte: Adaptado de Iland et al. (2011).

Em videiras podemos encontrar dois tipos de gemas: a lateral e a composta (Morrison, 1991; Gerrath, 1992). As gemas laterais também conhecidas como “gema pronta” (no inglês “Prompt Bud”), se iniciam na axila da folha e se desenvolvem em brotações laterais ou ramos “netos” durante o mesmo ciclo de sua formação (Srinivasan e Mullins, 1981) não entrando em dormência, e quando não desenvolvem brotações, estas são geralmente abortadas (Morrison, 1991; Gerrath, 1992). A gema composta, também denominada de gema latente ou

dormente, se inicia na axila da bráctea e possui três componentes: a gema primária central e duas gemas secundárias menores. Cada componente da gema composta pode apresentar primórdios foliares e primórdios de inflorescência ou de gavinha (Morrison, 1991). Nesse caso, as flores são pequenas, reunidas em inflorescência, de coloração verde-clara podendo ser hermafroditas ou unissexuadas (Souza, 1996; Terra et al., 1997).

A brotação das gemas marca o momento inicial do ciclo vegetativo da videira, que terminará junto com a fase final de crescimento dos ramos, quando o desenvolvimento da planta cessa e a fase de dormência se inicia (Chao et al., 2007). O ciclo anual da videira compreende uma série de fases de desenvolvimento e fenômenos, tais como mobilização de reservas, crescimento vegetativo, acúmulo de reservas e repouso vegetativo ou dormência (Hidalgo, 2002; Reynier, 2003) (Figura 2).

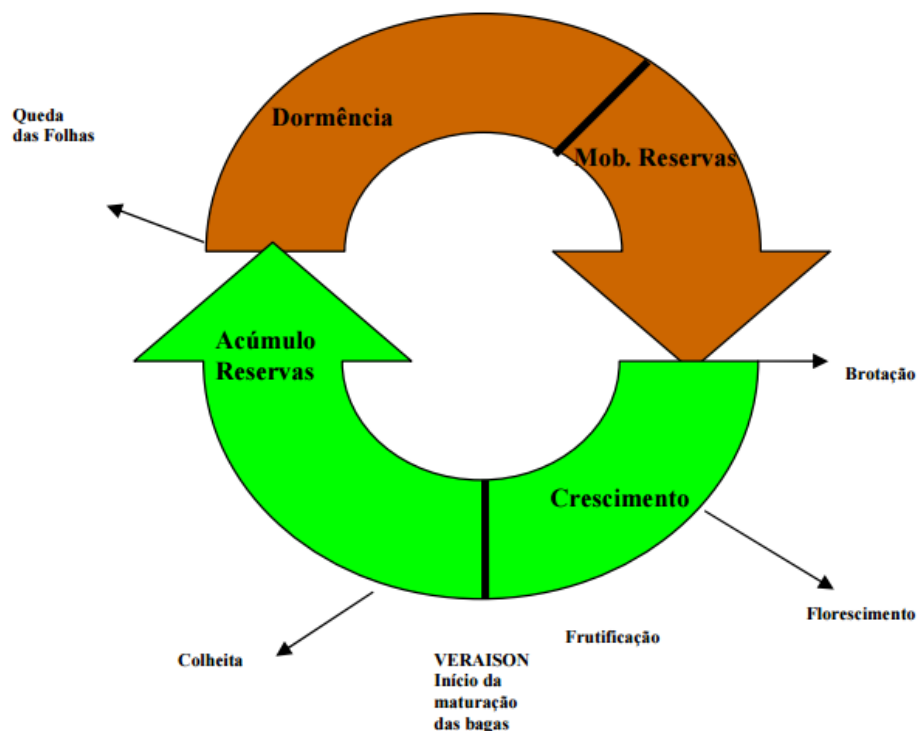


Figura 2 - Ciclo da videira visualizando as fases de dormência, mobilização de reservas, crescimento e acúmulo de reservas. Adaptação de Hidalgo (1993).

A duração desse ciclo é variável conforme a cultivar e as condições edafoclimáticas do local de cultivo (Serra, 2005). Assim, a data de poda passa a ser referência para o início do ciclo fenológico da videira, que é influenciado pelas condições de clima durante o período do ciclo (Leão e Silva, 2003; Neis et al., 2010; Anzanello et al., 2012). Segundo Kuhn e Maia (2001), Pommer (2006), Cabral (2009) e Souza (2013), o cultivo de videiras em áreas tropicais possibilita a obtenção de duas ou mais safras por ano.

### 3.3. Crescimento e desenvolvimento da baga

As bagas de uva são divididas basicamente em três partes: casca, polpa e sementes (Figura 3). Ao longo do desenvolvimento, as bagas passam por modificações no tamanho, composição, cor, textura e sabor (Coombe e McCarthy, 2000; Kennedy, 2002). Seus tecidos são subdivididos em porção externa, que consiste em tecidos entre a hipoderme e os vasos periféricos e a parte interna formada de vasos periféricos e axiais. A porção basal de vasos periféricos e axiais próxima ao pedicelo é conhecida como *brush* ou pincel, por onde são fornecidos água e solutos para a baga (Ribéreau-Gayon et al., 2003; Jackson, 2008).

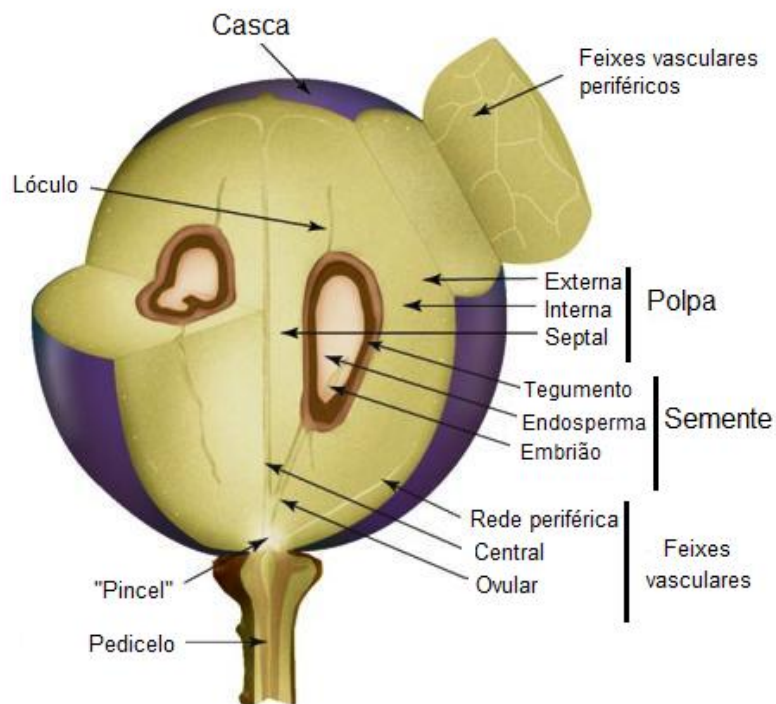


Figura 3. Esquema anômico da baga de uva. Fonte: Adaptado de Kennedy (2002).

O crescimento da baga em muitas variedades segue, normalmente, o padrão representado por uma dupla curva sigmoide (Tattersall et al., 1997; Coombe e McCarthy, 2000). Já para bagas de uva Niagara Rosada o padrão de dupla curva sigmoide não é mantido perfeitamente (Figura 4). Porém, se sabe que na primeira etapa, denominada estágio I (até 40 dias após o florescimento) ocorre principalmente divisão celular, iniciada logo após a fecundação, seguida da expansão das células da polpa, e ao final deste período, o número total de células da baga foi definido (Kennedy, 2002). Há vários solutos sendo acumulados, contribuindo para a expansão da baga (Possner e Kliewer, 1985). É nesse momento que o efeito da limitação de água na videira é refletido como uma flutuação hídrica, e conseqüentemente, influencia no tamanho da baga (Perez Peña, 2004).

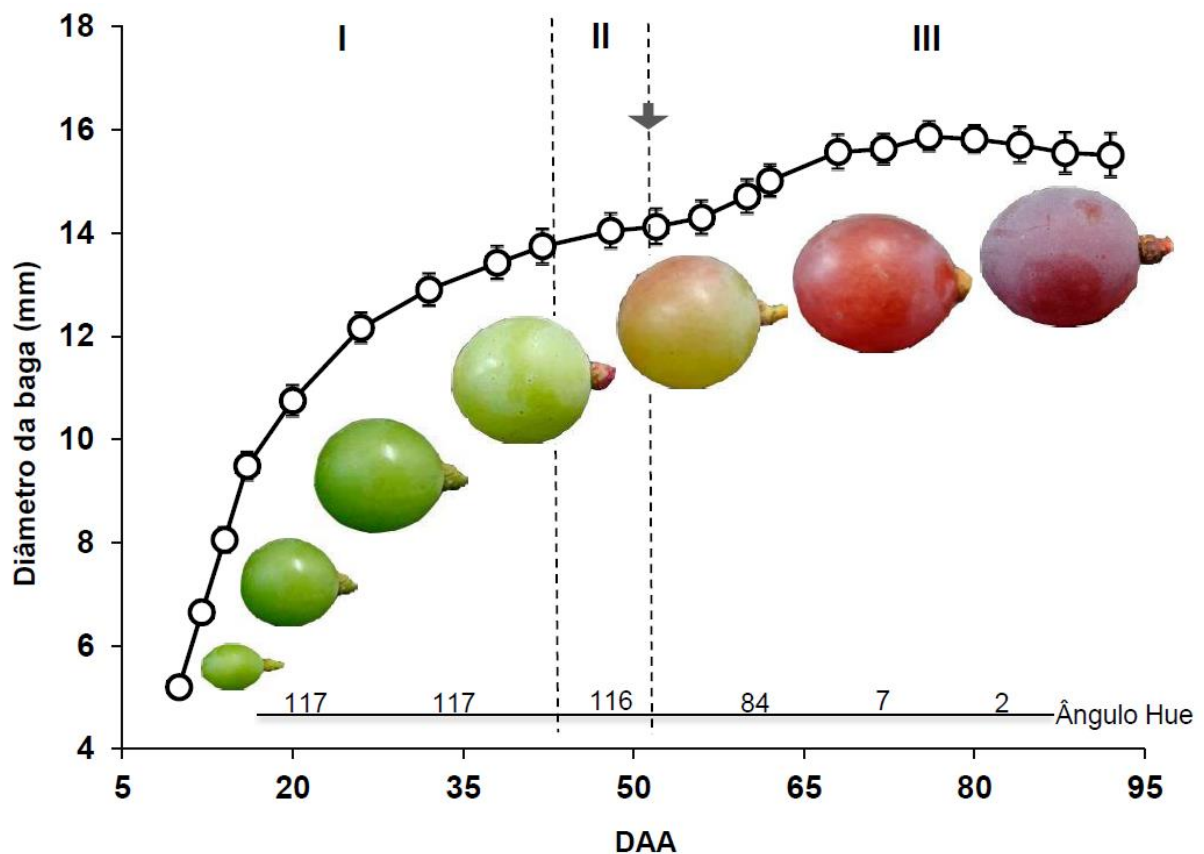


Figura 4 – Diagrama esquemático demonstrando o diâmetro e a coloração das bagas da variedade Niagara Rosada durante o desenvolvimento e a maturação. As duas linhas verticais pontilhadas indicam os limites estimados das três etapas de desenvolvimento: I: crescimento rápido; II: pouco crescimento; III: retorno do crescimento. A seta indica o *veraison*, transição da fase II para a III. Lerin (2016), uso autorizado pelo autor.

A segunda fase, estágio II do desenvolvimento do fruto (Fase *Lag*), que se inicia aproximadamente 7 a 10 semanas depois do florescimento e dura cerca de duas semanas, apresenta pouco ou nenhum crescimento (Pratelli et al., 2002; Hayes et al., 2007), enquanto a maturação da semente é completada (Lund e Bohlmann, 2006).

Após esse período de ausência de crescimento, há o amadurecimento do fruto, no qual ocorrem as maiores modificações na composição das bagas (Boss e Davies, 2001, citado por Conde et al., 2007). É nesse período que ocorre o “*veraison*”, palavra francesa, traduzida para o português como “pintor”, que indica o início do amadurecimento. Em uvas tintas, o pintor é visualmente percebido pela mudança na cor da casca (Hrazdina et al., 1984). Nesse momento, os frutos passam de um estado herbáceo em que eles são pequenos, duros, ácidos e com pouco açúcar para um estado nos quais se tornam maiores, macios, adocicados, menos ácidos e coloridos (Conde et al., 2007).

Do ponto de vista biológico, o amadurecimento é um fenômeno caracterizado por alterações bioquímicas e fisiológicas do fruto tornando-o comestível e atraente para a dispersão de suas sementes (Giovannoni, 2001). Já na abordagem agrônômica, o amadurecimento tem correspondência com alterações nos atributos sensoriais de sabor, odor, cor e textura que tornam o fruto aceitável para o consumo (Barros et al., 1995)

A fase de crescimento do fruto, denominada período de maturação, é caracterizada por diversas mudanças físicas e bioquímicas. As principais mudanças são amolecimento da polpa, aumento de tamanho do fruto, acúmulo de glicose e frutose no vacúolo, metabolismo do ácido málico como fonte de carbono para a respiração, e biossíntese de componentes orgânicos voláteis e de sabor, degradação da clorofila e acúmulo de antocianinas no exocarpo em cultivar de uva tinta (Dreier et al., 1998; Davies e Robinson, 2000; Kennedy, 2002).

Na terceira fase do desenvolvimento do fruto denominada estágio III ocorre grande expansão do fruto devido ao acúmulo de água nas células da polpa. Durante esse aumento do volume do fruto, algumas substâncias armazenadas na primeira fase são reduzidas como, por exemplo, o ácido málico,

que é metabolizado, enquanto outros como o ácido tartárico são apenas diluídos (Winkler et al., 1997; Ribéreau-Gayon et al., 2003).

Com o amadurecimento, o fruto torna-se mais atraente e saboroso, por causa do equilíbrio entre açúcares, ácidos, componentes do sabor, aroma e sabor (Lund e Bohlmann, 2006). O desenvolvimento destas características determinará a qualidade do produto.

#### 3.4. Vitalidade e morte celular da baga

A perda da vitalidade das células do mesocarpo é compreendida como a perda da capacidade seletiva da membrana, ocorrendo de forma acentuada em algumas variedades de uva, e pode estar intimamente ligada às mudanças no fluxo hídrico da baga (Lang e Thorpe, 1989; Krasnow et al., 2008; Tilbrook e Tyerman, 2008, 2009; Fuentes et al., 2010).

Diversos estudos têm relatado que a perda de vitalidade das células ocorre no final do amadurecimento, quando as bagas atingem o peso máximo (Lang e Düring, 1991; Dreier et al., 1998; Sadras e McCarthy, 2007). Em algumas variedades, após alcançar o peso máximo, é aparente o início da perda do peso da baga (Sadras e McCarthy 2007) e a concentração de açúcar pode ser aumentada por uma combinação de diminuição de volume da baga e importação de açúcar (Sadras e McCarthy 2007). Fuentes et al., 2010 encontraram uma correlação geral entre o grau de vitalidade dos tecidos e a diminuição do peso devido à murcha da baga. Para a variedade Syrah, especificamente, essa correlação foi evidente, enquanto outras variedades como Chardonnay e Thompson Seedless não apresentaram o mesmo padrão (Fuentes et al., 2010). Nesse trabalho, o tecido com menor vitalidade correlacionou-se com um maior grau de murcha.

O corante FDA (Diacetato de Fluoresceína) tem sido utilizado para comprovar a mudança na vitalidade celular do mesocarpo ao longo do amadurecimento das bagas. O FDA é uma molécula não-polar, permeável em membranas celulares íntegras. Após entrar na célula, o radical acetato da molécula de FDA é clivado por ésteres citoplasmáticos, tornando-se polar e produzindo fluoresceína que ficam presas nas células, apresentando fluorescência quando expostas a uma luz azul (Jones e Senft, 1985; Krasnow et al., 2008; Tilbrook e Tyerman, 2008, Lerin, 2016).

Portanto, a existência de ésteres citoplasmáticos ativos, juntamente com a funcionalidade da membrana celular e vacúolo, possibilita que a célula com fluoresceína apresente fluorescência. Consequentemente, a presença de fluorescência das células quando expostas à luz, implica na existência de integridade de membrana e indica existência de vitalidade celular (Jones e Senft, 1985; Krasnow et al., 2008; Tilbrook e Tyerman, 2008).

A perda da integridade da membrana celular em plantas marca o fim da homeostase e indica morte celular (Noodén 2004). No entanto, a morte celular programada é um evento comum em tecidos vegetais na parte final do ciclo de desenvolvimento (Greenberg, 1996; Thomas et al., 2009). Em uvas, estudos mostram que a morte celular programada ocorre em células do mesocarpo de bagas, na etapa final de amadurecimento, podendo ter interferência nas características sensoriais das bagas e afetar as relações hídricas entre baga e planta-mãe, devido à perda da competência osmótica da membrana celular (Lang e Düring, 1991; Krasnow et al., 2008; Tilbrook e Tyerman, 2008; Iland et al., 2011) e por fim, afetar a qualidade do fruto (Thomas et al., 2009).

Outro método utilizado para avaliar a viabilidade celular é o método baseado na redução do reagente MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio]). O MTT, que é solúvel em água e que apresenta coloração amarela, é um composto que, uma vez adicionado, sofre redução por desidrogenases celulares ativas, formando um cristal de coloração roxa, o *formazan*, que pode ser solubilizado e quantificado, espectrofotometricamente. Dado que a mitocôndria é o principal sítio das enzimas desidrogenases, a redução do MTT a *formazan* está diretamente associada à atividade mitocondrial e, portanto, à viabilidade celular (Gerlier e Thomasset, 1986; Heo et al., 1990).

### 3.5. Morte celular e espécies reativas de oxigênio

As espécies reativas de oxigênio (EROs) tornaram-se reconhecidas como moduladores fundamentais da morte celular programada (MCP), bem como muitos outros processos biológicos como o crescimento, o desenvolvimento e a adaptação ao estresse (Gechev et al. 2006). O envolvimento de moléculas, como, por exemplo, o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) durante a MCP da planta foi hipotético durante muito tempo. Além da ausência de métodos de detecção precisos e quantificáveis, a natureza tóxica inerente de EROs mascarou sua



função subjacente em várias redes de sinalização. Todavia, foi revelado que EROs tem relação com a indução, sinalização e execução da morte celular em plantas (Jabs, 1999; Bethke and Jones, 2001; Van Breusegem e Dat, 2006).

Posteriormente, foi comprovado que o excesso de EROs é capaz de causar danos irreversíveis às membranas celulares (Karuppanapandian et al. 2011). Está evidente que esse excesso nos níveis de EROs compromete o metabolismo celular, levando a danos bioquímicos e fisiológicos. Um exemplo já descrito se refere à estrutura e à função mitocondriais, que são alteradas, significativamente, durante o processo apoptótico (Petit et al., 1996; Kroemer, 1997). Há indícios que os agentes indutores da apoptose podem desencadear o desacoplamento do transporte de elétrons e da produção de ATP, levando a uma diminuição do potencial de membrana mitocondrial e posterior produção de EROs (Zamzami et al., 1995).

Um dos principais mecanismos moleculares que levam a mudanças profundas no funcionamento mitocondrial é causado por uma alteração no poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTP). O PTP, como é chamado, protege as mitocôndrias da perda de potencial eletroquímico de prótons ( $H^+$ ). Uma das proteínas-chave liberada através do PTP é o citocromo c. Sua liberação no citosol pelas mitocôndrias resulta em ruptura do transporte de elétrons, levando a um aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), e por fim desencadeia a MCP (Green e Reed, 1998; Lin et al., 2006; Taiz e Zeiger, 2017).

Dessa maneira, para se manter o equilíbrio da homeostase oxidativa há um sistema antioxidante constituído por enzimas antioxidantes e antioxidantes não enzimáticos, estabelecido em células vegetais (Gill e Tuteja, 2010). Esse sistema de defesa antioxidante é capaz de eliminar EROs, e assim, proporciona a proteção contra seus efeitos deletérios. Como exemplo de enzima antioxidante está a catalase (CAT), uma das mais estudadas e primeira a ser descoberta (Loew, 1990), capaz de realizar a decomposição do  $H_2O_2$ , a uma taxa extremamente rápida, para oxigênio e água (Aebi, 1984; Scandalios, 1993; Willikens et al., 1995). Essa enzima é encontrada em diferentes isoformas em várias espécies de plantas (Scandalios, 1987), sendo encontrada mais evidente em peroxissomos e glioxissomos (Iannone et al., 2010).

A produção ativa de  $H_2O_2$  ocorre principalmente no espaço apoplástico e é necessária para desencadear a "explosão oxidativa" que é uma parte da

resposta hipersensível a patógenos, no entanto, é um pré-requisito para o crescimento normal, desenvolvimento e morte celular (Miller et al., 2010). O  $H_2O_2$  é um fator de sinalização na resposta da planta a estímulos bióticos e abióticos externos, bem como em processos regulados pelo desenvolvimento (Petrov e Breusegem, 2012). O  $H_2O_2$  desempenha ainda papéis importantes na regulação do crescimento das plantas e do sistema de defesa (Niu e Liao, 2016).

A acumulação de  $H_2O_2$  tem sido detectada em diversas fases de transição: na videira no momento da quebra da dormência (Ophir et al., 2009), no girassol durante a libertação da dormência das sementes (Oracz et al., 2009), no tomate e videira na maturação dos frutos (Jimenez et al., 2002; Pilati et al., 2007; Lopez-Vidal et al., 2016) e na transição floral de *Arabidopsis* (Ye et al., 2000). Em *Vitis vinifera* cv. Pinot Noir o teor de  $H_2O_2$  da baga teve um aumento significativo durante o estágio de *veraison*, atingindo seu máximo depois de uma a duas semanas e, em seguida, diminuindo em um ritmo mais lento em direção ao tempo de colheita (Pilati et al., 2007).

Em videira foi relatada uma explosão oxidativa que coincide com a alteração da cor das bagas e a modulação dos desintoxicantes da espécie reativa de oxigênio (ROS) no nível do gene e da proteína, aumentando a possibilidade de ROS participar dos mecanismos de sinalização ocorridos na maturação do fruto (Pilati et al., 2007; Giribaldi et al., 2007; Negri et al., 2008; Fortes et al., 2011; Lijavetzky et al., 2012). O acúmulo de EROs durante o amadurecimento também foi encontrado em trabalhos com saskatoon (Rogiers et al., 1998), frutos de tomate (Mondal et al., 2004) e laranja (Huang et al., 2007).

A acumulação transitória de  $H_2O_2$  no citosol das células da casca da baga foi confirmada definitivamente no início da maturação em uvas Pinot Noir. Os níveis de  $H_2O_2$  foram medidos separadamente na casca e na polpa. Enquanto na polpa observou-se uma diminuição gradual do  $H_2O_2$ , na casca se observou uma clara acumulação de  $H_2O_2$  no início da maturação, com um máximo nas amostras coletadas há nove semanas após o florescimento (Pilati et al., 2014). Embora seja difícil medir  $H_2O_2$  em tecidos de plantas com precisão (Queval et al., 2008), o acúmulo ficou evidente em casca de bagas durante amadurecimento e mudança de cor. No entanto, Pilati et al., 2014 apenas focaram na casca da baga, não investigando mais a fundo o mesocarpo do fruto.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Material vegetal

Os experimentos foram realizados com videiras cultivadas em vasos com capacidade para 25L de solo, contendo como substrato uma mistura de Latossolo Vermelho-Escuro (LVE), distrófico, textura argilosa, esterco de curral e areia, na proporção 1:1:1. As avaliações foram realizadas em bagas da variedade Niagara Rosada (*Vitis labrusca* L.) enxertadas sobre porta-enxerto IAC 572, plantadas em abril de 2013, conduzidas no sistema de espaldeira e irrigadas por gotejamento, na casa de vegetação do setor de fisiologia vegetal, com estrutura telada, localizada no campus da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, em Campos dos Goytacazes, RJ. Foram utilizadas também bagas de *Vitis vinífera* var. Thompson Seedless com 74 dias após antese (DAA), aproximadamente, provenientes de vinhedo comercial em Juazeiro-BA e adquiridas em estabelecimento comercial no ponto de colheita. Os DAA de Thompson Seedless foram obtidos a partir de informação gerada pela empresa e confirmados a partir de informações técnicas da região produtora (Leão, 2005).

### 4.2. Estratégia experimental

Como o principal objetivo desse trabalho foi obter uma caracterização geral do processo de morte celular prematura em bagas de Niagara Rosada (*Vitis*

*labrusca* L.), realizou-se esse estudo em duas fases metodológicas e se utilizou a *Vitis vinifera* var. Thompson Seedless, uma variedade de uva sem semente, como referência de vitalidade celular nas análises com corante FDA e no ensaio bioquímico com MTT.

A Fase I teve como foco a análise da morte celular prematura, cujas análises foram direcionadas à verificação de mudanças estruturais nas células do mesocarpo com uso de corante, ao longo do amadurecimento da baga.

A Fase II teve como foco as mudanças no metabolismo celular relacionado à morte celular do mesocarpo ao longo do amadurecimento da baga.

Juntamente, os resultados das avaliações físicas e químicas das bagas de Niagara Rosada foram utilizados para relacionar e justificar os resultados encontrados para a vitalidade celular, durante desenvolvimento das bagas em dias após a antese, além de, caracterizar qualitativamente esta variedade em cada período de avaliação.

#### **4.2.1. Fase I: Desenvolvimento do mesocarpo durante a maturação da baga**

##### **4.2.1.1. Caracterização tecidual de morte celular**

O uso do corante Diacetato de fluoresceína (FDA) foi utilizado para comprovar a perda de permeabilidade das membranas, e conseqüentemente, a perda de vitalidade das células do mesocarpo na expectativa de comprovar a morte do tecido. As avaliações aconteceram aos 33, 43, 49, 53, 67 e 86 DAA. Para essa análise, foram coletados cinco cachos, padronizados por diâmetro médio das bagas e armazenados em sacos plásticos sob resfriamento para evitar perdas por transpiração. No laboratório, três bagas de cada cacho foram excisadas com auxílio de bisturi, longitudinalmente, e uma das metades foi utilizada para coloração com FDA. A outra metade de cada baga teve o suco coletado para quantificação dos sólidos solúveis totais (SST). Foi utilizada ainda, bagas da variedade Thompson Seedless, aos 74 DAA, como referência desta caracterização.

A análise de vitalidade celular seguiu a metodologia de Jones e Senft, (1985); Krasnow et al. (2008); Tilbrook e Tyerman, (2008); Fuentes et al. (2010); Bonada et al. (2013). A solução foi preparada com a adição de 2 µl de uma solução de estoque 4,8 mM de FDA (em acetona) para 1 ml de solução de

sacarose equilibrada para, aproximadamente, 10° Brix. Dez minutos após ter sido feita, cerca de 250 µl da solução foram colocados sobre toda a superfície das metades cortadas de cada baga e mantidas no escuro durante 20 minutos, para permitir a absorção do corante antes da visualização. A fluorescência do FDA no mesocarpo das bagas cortadas foi visualizada no comprimento de onda do verde com auxílio de um estereoscópio fluorescente binocular (Nikon, StereoSMZ800, Japão). As imagens digitais foram processadas a fim de obter o percentual de fluorescência e análise de padrão de pixels com auxílio de software de imagens *Image J*, versão 1.51j8 (NIH, USA) (Figura 5).

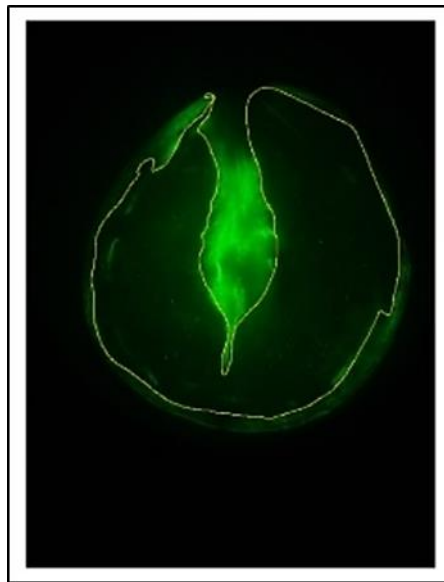


Figura 5. Exemplo de baga da variedade Niagara Rosada corada com FDA mostrando a área, traçada a mão, com e sem fluorescência, no software de imagens *Image J*.

#### **4.2.2. Fase II: Mudanças no metabolismo celular relacionadas à morte celular e à atividade antioxidante do mesocarpo durante a maturação da baga**

##### **4.2.2.1 Ensaio de atividade respiratória por MTT**

Para esse ensaio, as bagas foram coletadas em três estádios principais (EL 33:pré-veraison, EL 35:veraison e EL 38:pós-veraison) em casa de vegetação e mantidas sob refrigeração até o momento da maceração. A maceração foi

realizada com auxílio de pistilo em almofariz congelados. Como forma de comparação foram utilizadas bagas de uva Thompson Seedless, aos 74 DAA.

O extrato foi constituído de 2g de bagas sem casca e sem sementes em 6 mL do tampão de homogeneização contendo 100 mmol/L de tampão fosfato de sódio (pH 7,5), 0,5 mmol/L de EDTA- $\text{Na}_2$  e 10 mmol/L de ácido ascórbico e 1% de Polivinilpolipirrolidone (PVPP). Após a maceração, as amostras foram adicionadas em tubos falcon 15 mL mantidos em gelo e esperou-se a decantação de material em suspensão por, aproximadamente, 20 minutos. Em seguida o sobrenadante foi coletado e adicionado em microtubos tipo *ependorf* de 1,5 mL a fim de obter 3 alíquotas, e levadas à centrifuga (Hettich® MIKRO 200/200R) a 1000g, 4°C, por 6 minutos. O sobrenadante dessa centrifugação foi utilizado para preparar as amostras, que foram diluídas em 499,9  $\mu\text{L}$  de tampão de maceração. Após a diluição foram colocados 500  $\mu\text{L}$  de amostra em placa de 24 poços (marca TPP®). A solução de MTT foi preparada diluindo 10mg/ml de MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio) em água. A seguir, foi adicionado 25  $\mu\text{L}$  do MTT em cada poço da placa que foi mantida no escuro por, aproximadamente, 20min em temperatura ambiente com papel alumínio a fim de evitar a foto-oxidação. Durante esse tempo, foi preparada a solução reveladora (80 mL de isopropanol e 120  $\mu\text{L}$  de HCl). Após este período, a solução de MTT foi removida da placa e descartada com cuidado com auxílio de pipeta, e posteriormente, foi adicionado 500  $\mu\text{L}$  da solução reveladora para solubilizar os cristais de *formazan*. Após a completa solubilização dos cristais, a solução foi coletada e centrifugada por 6000rpm, a 4°C durante 10 min. Por fim, o precipitado da centrifugação foi descartado e 2000  $\mu\text{L}$  do sobrenadante provenientes de quatro poços foram transferidos para uma cubeta de *quartz* (Agilent Technologies, Inc, UK) para leitura a 570nm em espectrofotômetro (Varian Cary® 50 UV-Vis, CA, USA). Para leitura do branco foi utilizada somente a solução reveladora.

#### **4.2.2.2 Atividade da enzima catalase (CAT)**

A atividade foi realizada a partir de um ensaio bioquímico com posterior análise por espectrofotometria segundo Aebi, 1984 e Zhang et al., 2005 com algumas modificações. Para isso foram coletadas bagas em casa de vegetação em três estádios previamente descritos (EL 33 com 33 DAA, EL 35 com 43 DAA e

EL 38 com 86 DAA). As bagas foram mantidas sob refrigeração até o momento da pesagem e posterior maceração. A maceração foi imediatamente após a colheita e realizada com auxílio de almofariz e pistilo previamente resfriados. O extrato foi constituído de 2g de bagas sem casca e sementes em 6 mL do tampão de homogeneização contendo 100 mmol/L de tampão fosfato de sódio (pH 7,5), 0,5 mmol/L de EDTA- $\text{Na}_2$  e 10 mmol/L de ácido ascórbico e 1% de Polivinilpolipirrolidone (PVPP). Após a maceração, as amostras foram adicionadas em tubos falcon 15 ml mantidos em gelo e esperou-se a decantação de material em suspensão por, aproximadamente, 20 minutos. Em seguida o sobrenadante foi coletado e adicionado em microtubos tipo *ependorf* de 1,5 mL e levados à centrífuga (Hettich® MIKRO 200/200R) a 15000g, 4°C, por 20 minutos. O sobrenadante dessa centrifugação foi utilizado para o meio reacional contendo 1,7 mL de 50mmol/L de tampão fosfato de sódio (pH 7,0), 1 mL de água destilada, 0,2 mL da amostra e 0,1 mL de 100mmol/L de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Para a leitura do branco não foi utilizado  $\text{H}_2\text{O}_2$ . As leituras foram realizadas em cubetas de quartz com comprimento de onda de 240 nm em espectrofotômetro modelo Varian Cary® 50 UV-Vis observando a queda das absorbâncias. A atividade foi expressa como mU / mg de proteína, onde 1 mU foi definido como a quantidade de enzima que causou uma alteração de 0,001 na absorbância por minuto. Para a dosagem de proteína foi utilizado o método de Bradford (Bradford, 1976).

### **4.3. Análises qualitativas do desenvolvimento das bagas**

As análises de peso, diâmetro, sólidos solúveis totais, e deformabilidade foram realizadas utilizando-se 6 bagas. Ao longo do ciclo de desenvolvimento foram realizadas 6 avaliações que se iniciaram, em torno de, 30 DAA e foram realizadas até os 86 DAA. Por fim, os dados obtidos foram descritos graficamente.

#### **4.3.1 Peso e sólidos solúveis totais**

O peso de cada baga, retirada da parte proximal, média e distal dos cachos foi registrado individualmente com balança modelo FA-2104N, Bioprecisa e obtida a matéria fresca ao longo do desenvolvimento dos frutos. O suco de cada baga utilizada na medição do peso foi coletado individualmente para avaliação

dos sólidos solúveis totais, utilizando um refratômetro digital, com compensação de temperatura, modelo DRBS-300, França.

#### **4.3.2. Deformabilidade das bagas**

A deformabilidade das bagas foi medida por meio do ponto médio do fruto, região com maior diâmetro, usando um texturômetro modelo TA-XT express (Stable Micro Systems, UK), que exerce uma força constante gerada por uma mola. Esse método possibilitou o cálculo da força de deformação em bagas individuais a partir da resposta na diminuição de 20% do diâmetro.

#### **4.3.3. Diâmetro das bagas em desenvolvimento**

Bagas da parte proximal, média e distal de cachos em diferentes videiras, representativas de toda área experimental (n=6), foram padronizadas e marcadas. As medições foram realizadas, em milímetros, com paquímetro digital (Digimess®).

#### **4.4 Análises estatísticas**

O delineamento inteiramente casualizado (DIC) foi empregado para os resultados das variáveis, massa fresca, diâmetro, sólidos solúveis totais, deformabilidade das bagas e contou com 6 repetições. Já para análise da taxa de perda de vitalidade celular foram utilizadas 3 repetições. Os ensaios da atividade da catalase e MTT foram feitos a partir de 3 repetições por estágio e seguidos por quadruplicata durante a análise. Para a interpretação dos resultados, foi utilizado o programa computacional GraphPad Prism 7.0 e utilizada a análise por regressão linear.



## 5. RESULTADOS

### 5.1. Vitalidade das células do mesocarpo

As imagens do mesocarpo de bagas cortadas longitudinalmente e coradas com uma solução FDA mostram uma evidente perda de vitalidade celular ao longo do amadurecimento.

A figura 6 mostra a fluorescência presente em praticamente todo o mesocarpo da baga aos 33 DAA. Em comparação às demais datas de avaliação, (43 DAA até 67 DAA), a fluorescência diminuiu progressivamente, chegando aos 86 DAA com a menor marcação do mesocarpo. Tais evidências suportam a ideia de que a perda de vitalidade das células do mesocarpo acontece logo após o *veraison*, que ocorreu aos 43 DAA. As bagas exibiram uma gradual perda de vitalidade celular percebida inicialmente, na porção interna do fruto, próxima às sementes, se expandindo para grande parte da superfície das bagas ao longo do desenvolvimento. A região do *brush* (porção central) se manteve fluorescente até o final do amadurecimento das bagas, presumindo-se, então, a existência de vitalidade celular nessa região.

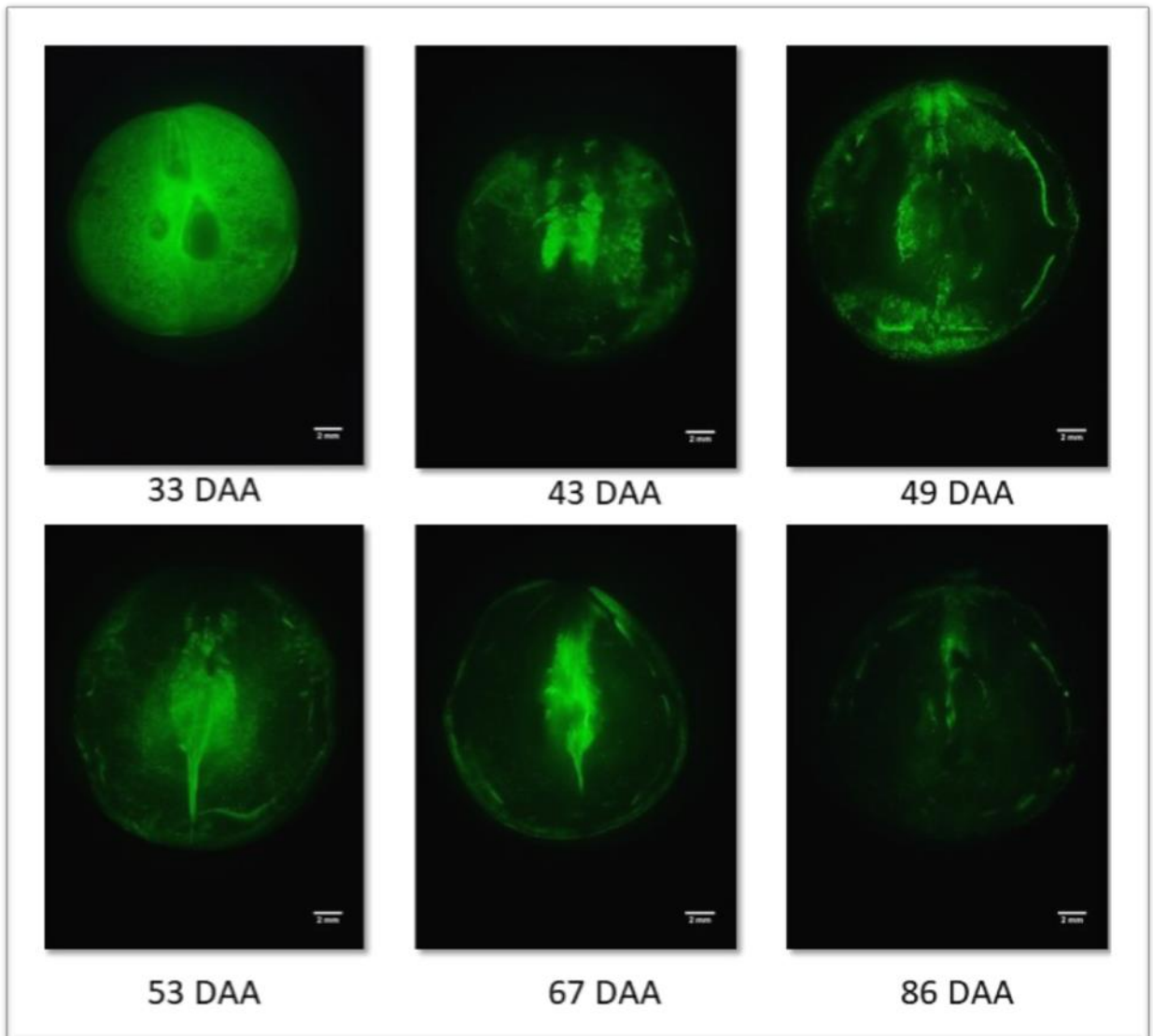


Figura 6. Bagas de *Vitis labrusca* (variedade Niagara Rosada) cortadas longitudinalmente, coradas com FDA, evidenciando a área fluorescente com vitalidade celular.

A porcentagem média da área com vitalidade celular no mesocarpo ao longo do desenvolvimento das bagas é apresentada na Figura 7. É possível notar a queda abrupta dos 33 DAA para os 43 DAA, e ainda a contínua redução até os 86 DAA.

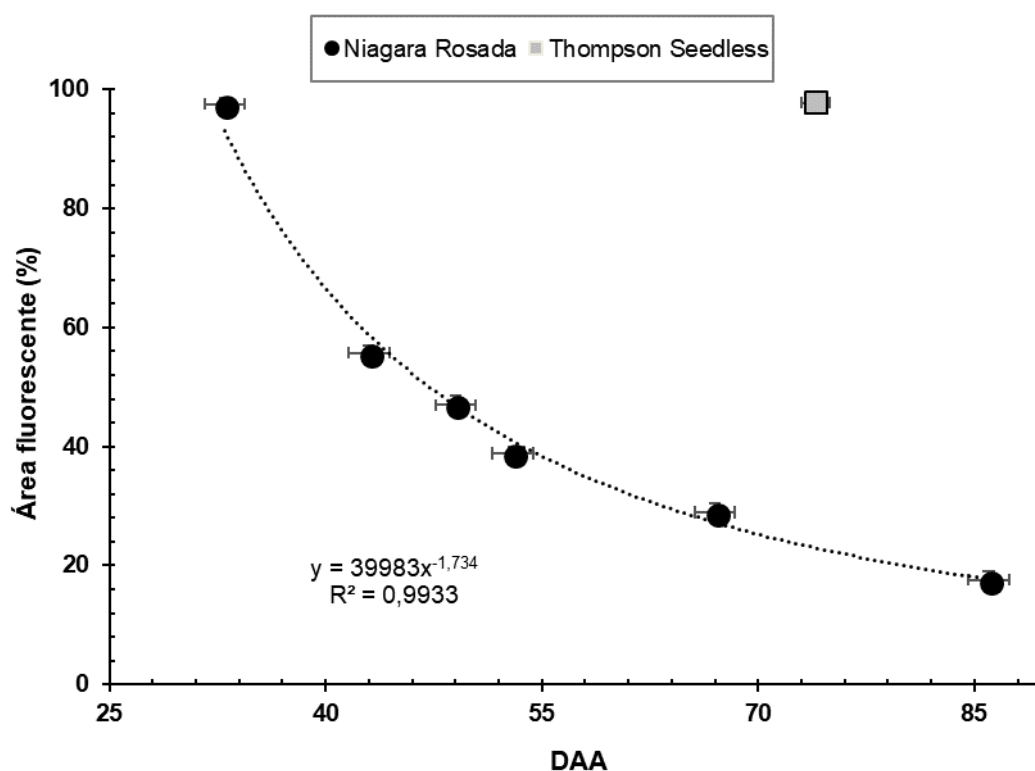


Figura 7. Porcentagem de área fluorescente (com vitalidade celular) do mesocarpo ao longo do desenvolvimento de *Vitis labrusca* (variedade Niagara Rosada) em dias após a antese e variedade Thompson Seedless, aos 74 DAA. Cada ponto representa a média de três repetições e as barras verticais representam o erro padrão da média.

As porcentagens de área com vitalidade celular variaram entre valores médios iniciais de 97% aos 33 DAA, diminuindo para 17% aos 86 DAA (Figura 7). Ocorreu, portanto, uma perda de vitalidade de, aproximadamente, 80% durante o ciclo de desenvolvimento, desde o início do crescimento das bagas até atingirem o amadurecimento. Nós também testamos bagas de *Vitis vinifera* (variedade Thompson Seedless), no estágio pós-veraison, aos 74 DAA. O mesocarpo de Thompson Seedless não perde vitalidade celular mesmo nos períodos extremos de amadurecimento. O valor médio de viabilidade celular foi de 97%, o mesmo valor encontrado, aos 33 DAA, em Niagara Rosada (Figura 8).

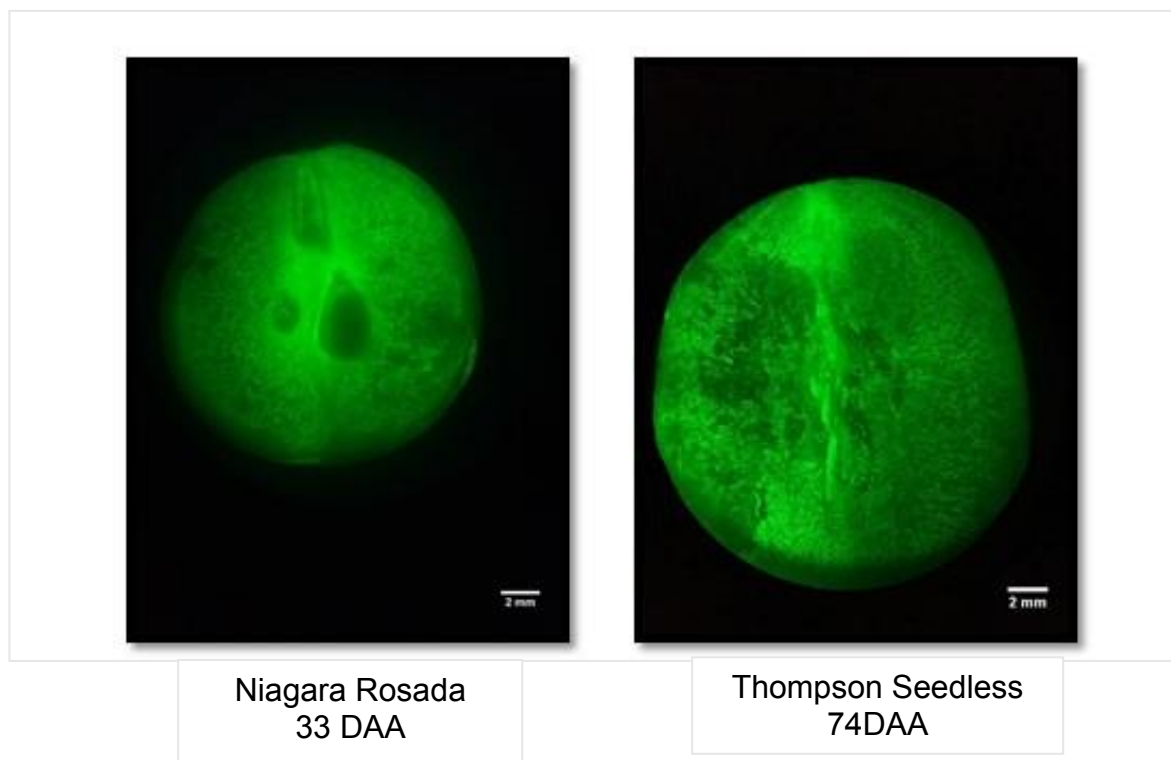


Figura 8. Comparação de bagas de *Vitis labrusca* (variedade Niagara Rosada) e *Vitis vinifera* (variedade Thompson Seedless), coradas com FDA.

Como esperado, a vitalidade celular teve correlação negativa com as variáveis sólidos solúveis totais, peso e diâmetro (Tabela 1). Ou seja, à medida que diminuía a vitalidade celular do mesocarpo, os sólidos solúveis totais, o peso e o diâmetro das bagas aumentavam.

**Tabela 1.** Coeficiente de correlação linear de Pearson ( $r$ ) entre vitalidade celular do mesocarpo (VCM) e as variáveis sólidos solúveis totais (SST), massa fresca e diâmetro avaliadas ao longo do desenvolvimento de bagas da variedade Niagara Rosada.

Correlação	Coeficiente de correlação ( $r$ )	Significância
SST x VCM	-0,9714	**
MASSA FRESCA x VCM	-0,9148	**
DIÂMETRO x VCM	-0,8403	**

\*\*Significativo em 1 % de probabilidade

As imagens obtidas com o corante FDA demonstraram também, uma variação nos valores de pixels a partir da análise comparativa de transectos (proximal, central e distal). As regiões de células citoplasmáticas com fluorescência apresentaram maiores valores de pixels, comparadas a regiões sem vitalidade celular (Figura 9). A baga de Niagara Rosada, aos 63 DAA, apresentou maiores valores de pixels próximos à região central (*brush*), onde estão localizados os vasos que fornecem água e solutos. Quando a baga estava no final do amadurecimento (86 DAA) foi possível detectar valores para pixels, ainda que menores, nessa região.

A variedade Thompson Seedless, aos 74 DAA, por sua vez, apresentou uma dispersão de pixels dos transectos bem próximos, sem picos discrepantes, como encontrado aos 63 e 86 DAA em Niagara Rosada. O mesmo padrão de dispersão foi encontrado aos 33 DAA em Niagara Rosada, no qual ainda obtiveram uma sobreposição dos valores de pixels (Figura 9).

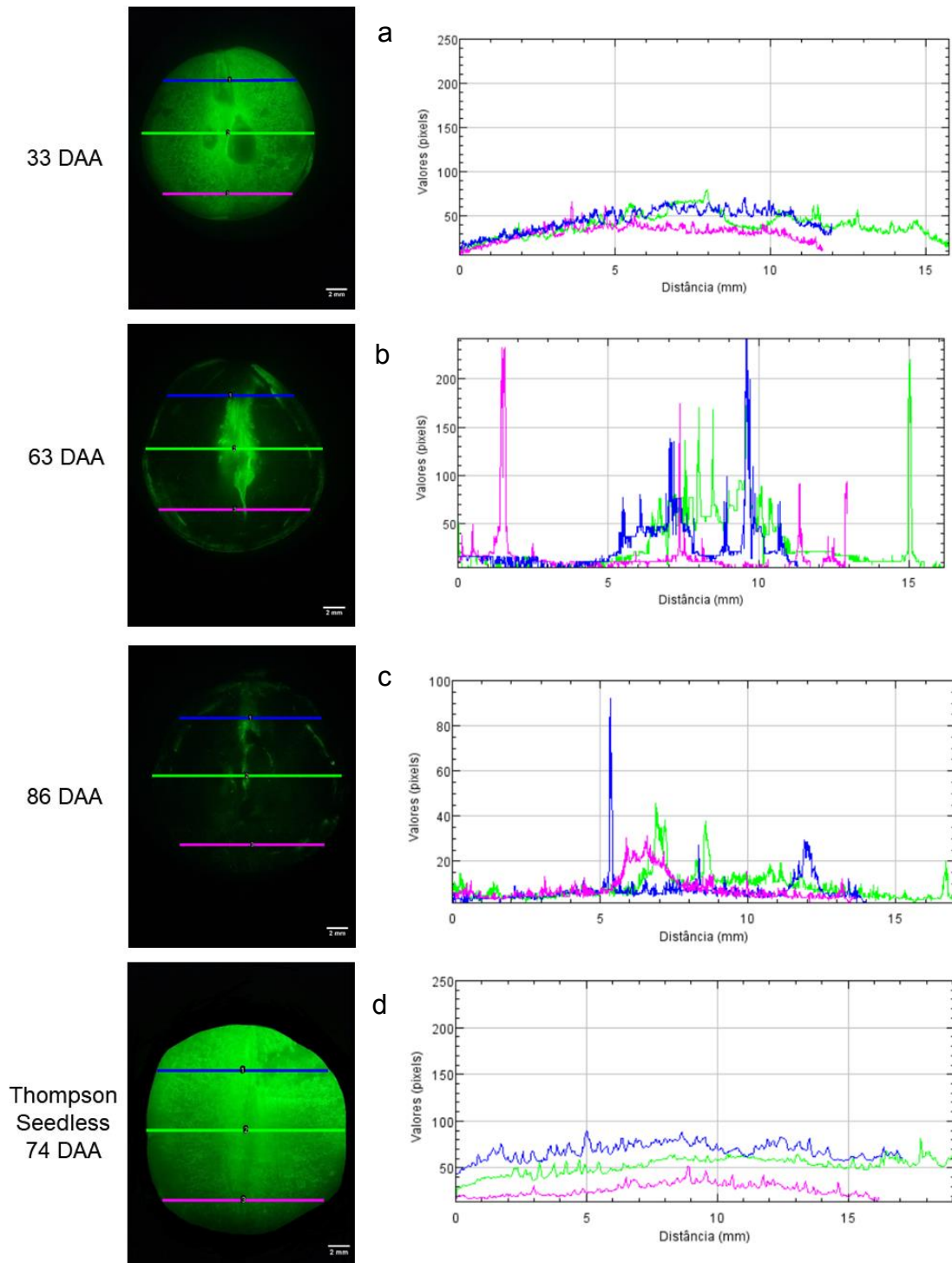


Figura 9. O padrão de dispersão de vitalidade celular com FDA difere entre os transectos da baga de *Vitis labrusca* (variedade Niagara Rosada) (a, b e c) e *Vitis vinífera* (variedade Thompson Seedless) (d) em dias após antese (DAA). Os transectos proximais ( — ), centrais ( — ) e distais ( — ) foram desenhados e os pixels analisados.

## 5.2. Atividade mitocondrial no mesocarpo

### 5.2.1. Ensaio colorimétrico com MTT

O ensaio colorimétrico com o corante MTT demonstrou bioquimicamente a atividade respiratória no mesocarpo das bagas. Uma redução ao longo do amadurecimento de Niagara Rosada pode ser observada. Aos 33 DAA as bagas mantiveram atividade respiratória em torno de 99%, valor próximo ao encontrado para Thompson Seedless aos 74 DAA, que nesse caso foi usada como referência. Em comparação, as bagas de Niagara Rosada aos 43 DAA e 86 DAA apresentaram uma redução no percentual, com valores médios de 15% e 25%, respectivamente, como apresentado na Figura 10.

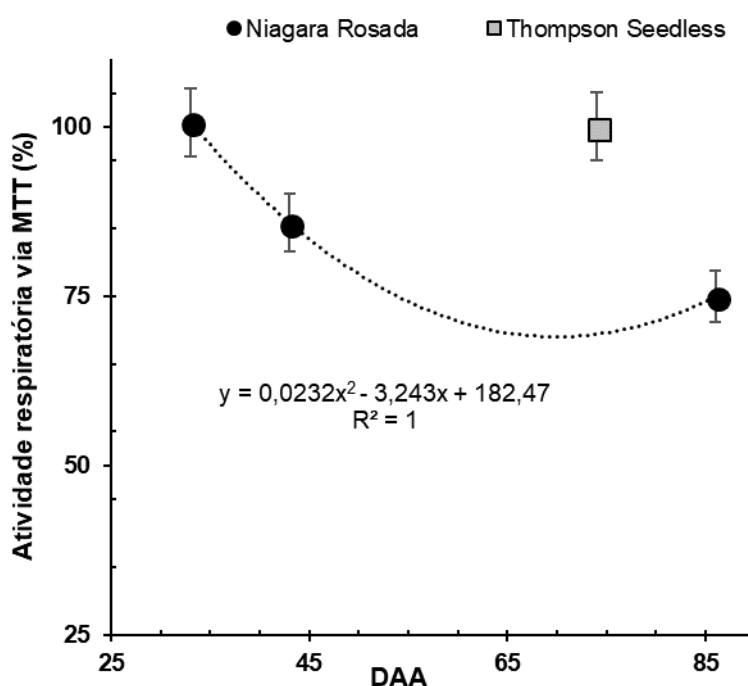


Figura 10. Atividade respiratória pelo ensaio com MTT de bagas de *Vitis labrusca* (variedade Niagara Rosada) e *Vitis vinifera* (variedade Thompson Seedless) em dias após a antese (DAA). Cada ponto representa a média de três repetições e as barras verticais representam o erro padrão da média.

### 5.2.2. Atividade da enzima catalase (CAT)

A atividade da catalase foi investigada devido à sua relevância na remoção de  $H_2O_2$ . A atividade enzimática apresentou valores médios iniciais de 14,12 mU CAT/mg de proteína, aos 33 DAA. No *veraison* (43 DAA) foi observado um aumento, com valor médio de 18,13 mU CAT/mg de proteína, seguido por uma redução no final do amadurecimento das bagas de Niagara Rosada, aos 86 DAA, no qual os valores atingiram 9,20 mU CAT/mg de proteína. (Figura 11).

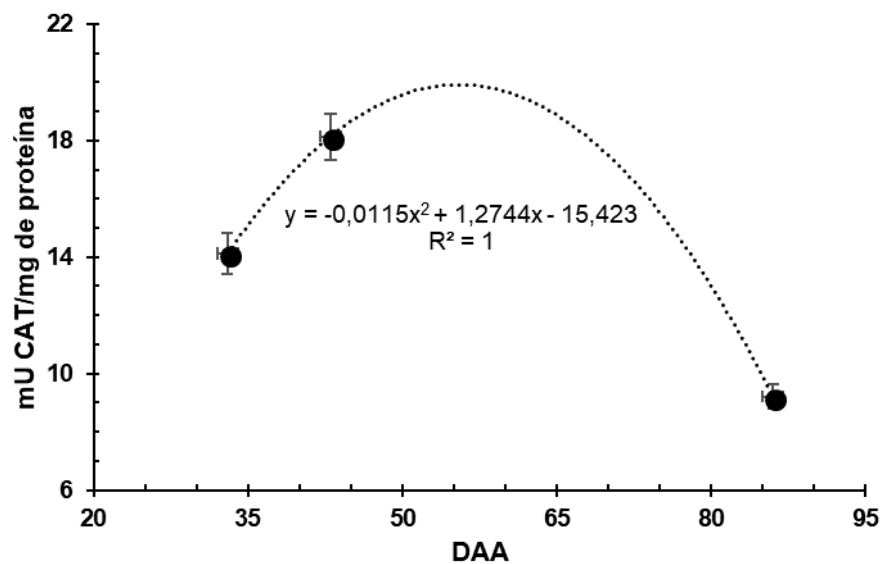


Figura 11. Atividade da enzima catalase em mesocarpo de bagas de *Vitis labrusca* (variedade Niagara Rosada) em dias após a antese. Cada ponto representa a média de três repetições e as barras verticais representam o erro padrão da média.



### 5.3. Caracterização do amadurecimento da baga

O crescimento das bagas seguiu um padrão de desenvolvimento baseado em uma sigmoide dupla (figura 12A), visto pela mudança no diâmetro, sendo possível perceber um período com crescimento mais lento (etapa II, dos 40 até os 51 dias após a antese, DAA) entre as duas fases de crescimento eminente (etapa I: formação e crescimento das bagas e etapa III: retorno do crescimento e alterações das propriedades químicas das bagas). O diâmetro apresentou um acréscimo de 15,00 mm aos 43 DAA, alcançando aos 86 DAA, 21mm, aproximadamente.

Os sólidos solúveis totais (SST) tiveram um aumento progressivo a partir do *veraison* (43 DAA). A taxa de sólidos solúveis acumulada aumentou durante o desenvolvimento, passando de 12,36 °Brix aos 43 DAA para 14,45 °Brix aos 53 DAA até alcançar 20°Brix aos 86 DAA, quando as bagas atingiram o amadurecimento completo (Figura 12A).

O amolecimento das bagas foi comprovado pela deformabilidade através da redução da força aplicada ao longo do amadurecimento das bagas. A mudança na deformabilidade ocorreu a partir dos 43 DAA, quando a força aplicada foi de 12,50 N, diminuindo para 4,84 N aos 86 DAA (Figura 12B).

O peso de matéria fresca médio das bagas aumentou gradativamente, sendo que aos 43 DAA houve um acréscimo expressivo, passando de 2,55g para 2,97g aos 49 DAA. O peso máximo das bagas foi em média de 4,19g, alcançando em torno dos 86 DAA (Figura 12C).

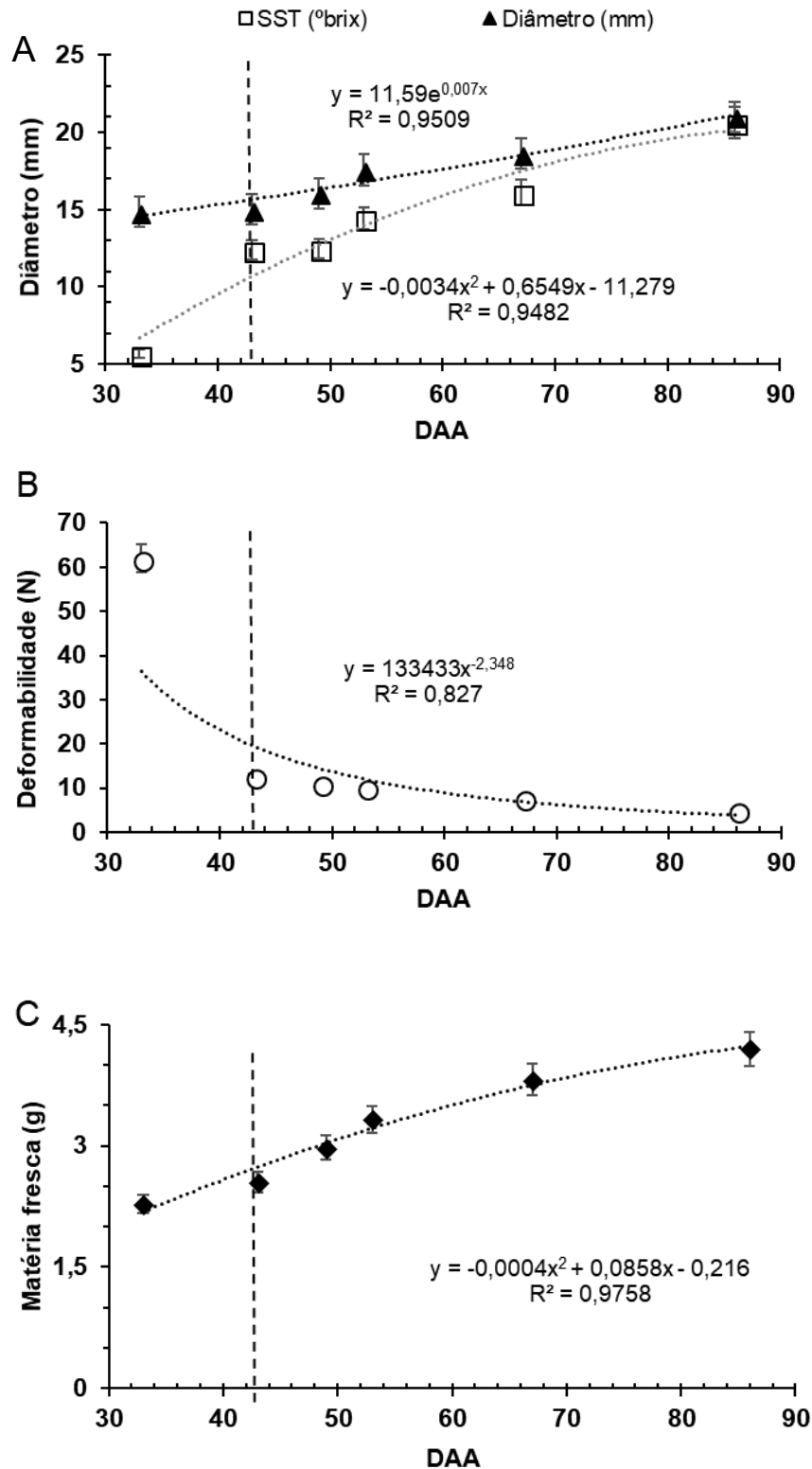


Figura 12. Diâmetro e sólidos solúveis totais (°Brix) de bagas de *Vitis labrusca* (variedade Niagara Rosada) (A); Deformabilidade (B) e matéria fresca (C) durante o desenvolvimento de bagas de Niagara Rosada em intervalos de dias após a antese (DAA). A linha vertical pontilhada representa o *veraison*. Cada ponto representa a média de seis repetições e as barras verticais representam o erro padrão da média.

## 6. DISCUSSÃO

Os resultados encontrados neste trabalho comprovam que ocorre a perda de integridade das membranas celulares, isto é, a perda de vitalidade celular no mesocarpo de bagas de *V. labrusca* variedade Niagara Rosada, logo após o *veraison*. Nós consideramos que essa perda é prematura quando comparadas às variedades estudadas, especificamente de *V. vinifera*. Ainda se percebeu manutenção da atividade mitocondrial e redução da atividade da enzima antioxidante catalase nos períodos avaliados.

Estudos mostram que variedades de uva apresentam perda de vitalidade celular no final do seu ciclo de desenvolvimento. Dentre essas podemos citar as variedades viníferas como Shiraz e Chardonnay que apresentaram perda de vitalidade no final do ciclo, ou seja, no estágio pós-*veraison*, a partir dos 100 DAA (Tilbrook e Tyerman, 2008; Fuentes et al., 2010). No entanto, ao avaliarmos o ciclo de Niagara Rosada, percebemos que a perda de vitalidade, ou seja, a morte celular no mesocarpo, iniciou no *veraison*, aos 43 DAA, e por isso podemos dizer que essa perda de vitalidade é prematura por ocorrer logo no início do amadurecimento. De uma forma distinta, em Thompson Seedless essa manutenção de vitalidade foi observada no final do amadurecimento e inclusive no período pós-colheita. As bagas desta variedade conseguem gerar pressões negativas no xilema do pedicelo e mantêm uma contínua e funcional conexão com o xilema do pedicelo. Isso indica que as células viáveis sustentam esse

gradiente de pressão à medida que a baga amadurece (Tilbrook e Tyerman, 2008).

A Niagara Rosada, assim como a Chardonnay conseguem manter a vitalidade do tecido vascular na região do *brush*, onde estão localizados os vasos condutores, mesmo com a detecção da intensa perda de vitalidade no mesocarpo. Segundo Tilbrook e Tyerman (2008) esse fato explica que o transporte de água e soluto entre a baga e a planta-mãe ainda pode ser mantido, provavelmente a partir da movimentação da água via floema já que nos vasos xilemáticos da região do *brush*, a resistência hidráulica se torna maior ao longo do amadurecimento da uva (Tyerman et al., 2004).

Com a análise dos pixels por transectos, conseguimos sustentar as informações fornecidas nas imagens com FDA. De fato, a região dos vasos condutores de Niagara Rosada, aos 86 DAA, havia fluorescência. Conforme se afastava nos transectos ao longo do mesocarpo, não havia detecção de fluorescência, ou seja, havia regiões com membranas não-viáveis. A variedade Shiraz apresentou um comportamento semelhante em estudos de Tilbrook e Tyerman (2008), que mostraram a variação de valores de pixels, comprovando membranas viáveis e não-viáveis ao longo do mesocarpo.

A evidente perda de vitalidade das membranas celulares, por si só, não é capaz de explicar a aparente manutenção da estrutura do mesocarpo. Dessa forma, realizamos o ensaio bioquímico com o MTT que mostrou uma redução da atividade mitocondrial ao longo dos estádios de desenvolvimento da baga de Niagara Rosada. Em comparação, a variedade Thompson Seedless, aos 74 DAA, manteve elevada atividade mitocondrial, bem próxima da atividade encontrada em baga de Niagara Rosada, aos 33 DAA.

A técnica com MTT possibilitou descrever, bioquimicamente, a atividade respiratória das células do mesocarpo por meio da atividade mitocondrial. Esses resultados com MTT mostram que, enquanto ocorre perda de vitalidade das células do mesocarpo, comprovada pelo FDA, a atividade mitocondrial é mantida. Diante disso, podemos dizer que as membranas mitocondriais permanecem íntegras e as enzimas desidrogenases presentes e capazes de reduzir o MTT a *formazan*. As membranas mitocondriais e as membranas plasmáticas já apareceram intactas no final do amadurecimento de bagas de *V. vinifera* x *V. labrusca* cv. Kyoho. Em estudos aprofundados na estrutura do mesocarpo dessa

variedade, Zhang et al. (1997) perceberam a manutenção das estruturas dessas membranas. Já em Thompson Seedless, foi identificada a manutenção de membranas celulares até no final do ciclo dessa variedade e, por isso, podemos afirmar que a manutenção dessas estruturas e, conseqüentemente, da vitalidade celular, é dependente de cada variedade e das condições ambientais (Tilbrook e Tyerman, 2008).

A integridade das membranas mitocondriais é frequentemente mantida até o final do processo de senescência dos frutos, ainda que a desintegração das membranas celulares seja visível e façam parte do final do processo de morte celular em plantas (Noodén, 2004). Esse fato pode explicar os valores de atividade mitocondrial encontrados próximos dos 75% no final do amadurecimento de bagas de Niagara Rosada. Com a manutenção dessa atividade, foi possível a redução do MTT a *formazan* e sua detecção, espectrofotometricamente, ainda que os resultados de FDA mostrassem a perda de integridade das células do mesocarpo.

A presença de um protoplasma funcional também pode ser capaz de explicar a manutenção da atividade mitocondrial encontrada em Niagara Rosada. Como identificado por Zhang et al. (1997), protoplasma funcional, com mitocôndrias intactas e numerosas, se forma durante o amadurecimento de *V. vinifera* x *V. labrusca* cv. Kyoho. Esse protoplasma é capaz de manter a integridade mitocondrial até o final do ciclo, e logo a manutenção do crescimento e amadurecimento dessa variedade. Dessa maneira, sugerimos que em Niagara Rosada o protoplasma possa estar presente como uma parte específica da fase do seu ciclo de desenvolvimento, uma vez que detectamos a atividade das mitocôndrias, enquanto o resultado com FDA mostra perda de integridade das membranas celulares do mesocarpo.

Com relação à integridade das membranas mitocondriais sabemos que pode ser perdida, uma vez que as mitocôndrias são as principais organelas responsáveis na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas células. O acúmulo de EROs pode prejudicar a integridade da membrana mitocondrial e, ao final, resultar em disfunção mitocondrial irreversível (Moller, 2001), que se acredita ser uma das principais causas da morte celular em diversos organismos, incluindo os frutos em amadurecimento (Qin et al., 2009). Sendo assim, a presença de enzimas antioxidantes é fundamental para as células vegetais. Uma

das principais enzimas estudadas é a catalase (CAT), capaz de eliminar o  $H_2O_2$ , uma das EROs (Miller, 2010).

Em Niagara Rosada nós avaliamos a atividade da CAT e os resultados mostraram valores menores no início do desenvolvimento e um incremento no *veraison*, seguido por uma redução no final do amadurecimento das bagas. Esse aumento de atividade no *veraison* pode ser um reflexo do acúmulo de EROs, principalmente o  $H_2O_2$ , uma vez que a atividade enzimática é dependente do seu substrato (Slesak et al., 2007). O aumento pode estar relacionado ainda com mudanças que ocorrem no funcionalismo mitocondrial e aumento na liberação do citocromo C pelo poro de transição mitocondrial PTP.

A liberação ocorre no citosol através do PTP e causa uma ruptura do transporte de elétrons causando um excesso de EROs e o início do processo de morte celular (Green e Reed, 1998; Lin et al., 2006; Taiz e Zeiger, 2017). Já a redução da atividade da CAT encontrada no final do amadurecimento significa que a capacidade da enzima em reduzir a concentração de  $H_2O_2$  é menor e, conseqüentemente, há maior possibilidade de ocorrer uma superprodução do  $H_2O_2$  e causar danos celulares irreversíveis (Xi et al., 2017).

O fenômeno de explosão oxidativa com aumento de  $H_2O_2$  no período do *veraison*, já foi identificado durante o desenvolvimento de bagas de uva Pinot Noir (Pilat et al., 2007; Pilat et al., 2014). Nessa mesma variedade foi encontrado cerca de 50% de perda de vitalidade celular no mesocarpo das bagas (Fuentes et al., 2010). Ainda que o  $H_2O_2$  tenha se mostrado inofensivo nessas bagas, podemos relacionar a perda de vitalidade com a superprodução de  $H_2O_2$  nessa variedade.

A ocorrência da perda de vitalidade celular em Niagara Rosada apresentada neste trabalho pode ter uma relação direta com a consistência do mesocarpo, visto que o mesmo se apresentou mais tenro e pouco crocante e um aspecto gelatinoso, conforme se avança o amadurecimento da baga. Além disso, a casca é espessa e revestida por uma camada de cera, que dificulta a perda de água por transpiração. Isto possibilita a manutenção de características físicas e químicas por um período mais prolongado, como visto também por Lerin (2016).

Nos resultados apresentados o início do amadurecimento denominado *veraison* foi registrado, aproximadamente, aos 43 DAA quando as bagas se tornaram amolecidas e com um rápido aumento nos sólidos solúveis totais. As bagas apresentaram também o retorno do crescimento logo a partir do *veraison*,

que pode ser explicado pela redução do potencial hídrico da baga como consequência do acúmulo de açúcares fornecidos via floema (Zhaosen et al., 2014).

O aumento da deformabilidade em bagas foi registrado e possibilitou identificar o início do *veraison*. Esse aumento corresponde à perda de turgescência, e é nesse momento que algumas variedades de uva, como, por exemplo, a Syrah, perdem massa fresca (McCarthy e Coombe, 1999; Thomas et al., 2006; Sadras e McCarthy, 2007).

A perda de massa fresca pode estar ligada à perda de integridade das membranas celulares do mesocarpo e à consequente perda de turgescência celular. Diante disso, foi proposta uma existência de uma correlação positiva entre a perda de massa fresca e tamanho com a perda de vitalidade celular em bagas no pós-*veraison* (Krasnow et al., 2008; Tilbrook e Tyerman, 2008; Fuentes et al., 2010). A variedade Niagara Rosada parece não seguir essa correlação, como observado nos dados obtidos. Apesar de as bagas terem apresentado uma redução da força utilizada para causar a deformabilidade, a partir dos 43 DAA, a perda de tamanho não ocorreu até o final do amadurecimento mesmo com a evidente perda de vitalidade celular ao longo do amadurecimento.

Diante dos resultados, observamos uma elevada correlação negativa entre a massa fresca, o diâmetro e os sólidos solúveis totais com a vitalidade celular do mesocarpo. Ou seja, ainda que a perda de vitalidade celular ocorra, essas variáveis apresentam aumento progressivo até o final do amadurecimento. Outras variedades que apresentam correlação negativa são a Chardonnay e Thompson Seedless, e esta ainda mantém suas características fisiológicas com elevada condutância hidráulica, um mesocarpo tenro e crocante e alta taxa de vitalidade celular (Fuentes et al., 2010).

No ciclo de desenvolvimento, seja de órgãos ou tecidos vegetais, a perda de vitalidade celular é um evento identificado em estádios finais (Greenberg, 1996; Thomas et al., 2009). Para bagas de uva, percebemos que a intensidade e o período que ocorre, parece ser determinado pela variedade e que há relações importantes entre a estrutura do mesocarpo e a presença de atividade celular. Portanto, ainda é necessário compreender mecanismos mais aprofundados ao longo de cada ciclo e que fazem cada variedade apresentar um comportamento diante da perda de vitalidade celular no mesocarpo.

## 7. CONCLUSÃO

As análises de vitalidade celular comprovaram que a perda de integridade das membranas celulares, ou seja, a morte celular é prematura quando comparada com demais variedades já estudadas e ocorre logo após o *veraison* em bagas de Niagara Rosada. Também foi observado a partir da análise bioquímica uma manutenção da atividade mitocondrial e uma redução da atividade da enzima antioxidante catalase em detrimento da perda de vitalidade celular no final do amadurecimento da baga. Já as mudanças fisiológicas avaliadas aconteceram no início do amadurecimento para a variedade Niagara Rosada, e ocorreu a manutenção de características físicas, como o aumento de peso e sólidos solúveis e conservação do tamanho da baga, mesmo quando ocorre uma elevada taxa de perda de vitalidade celular.



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. *Methods in enzymology*. Vol. 105. *Academic Press*. 121-126.
- Alvarenga, A.A.; Abrahão, E.; Regina, M.A. (1988) Origem e classificação botânica da videira. *Informe Agropecuário*, São Paulo, v. 19, n. 194, p. 5 – 8.
- Anzanello, R.; Souza, P.V.D., Coelho, P.F. (2012) Fenologia, exigência térmica e produtividade de videiras ‘Niagara Branca’, ‘Niagara Rosada’ e ‘Concord’ submetidas a duas safras por ciclo vegetativo. *Revista Brasileira de Fruticultura*, vol. 34, n. 2, p. 366-376.
- Barros, J.C.S.M., Ferri, C.P., Okawa, H. (1995) *Qualidade da uva fina de mesa comercializada na Ceasa de Campinas*. *Informações Econômicas*, São Paulo, 25 (7):53-61.
- Bethke, Paul C.; JONES, Russell L. (2001) Cell death of barley aleurone protoplasts is mediated by reactive oxygen species. *The Plant Journal*, v. 25, n. 1, p. 19-29.
- Bonada, M., Sadras, V.O., Fuentes, S. (2013) Effect of elevated temperature on the onset and rate of mesocarp cell death in berries of Shiraz and Chardonnay and its relationship with berry shrivel. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 19(1):87-94.
- Boss P.K., Davies C. (2001) Molecular biology of sugar and anthocyanin accumulation in grape berries. In: Roubelakis-Angelakis KA (Eds) *Molecular Biology and Biotechnology of the Grapevine*, *Kluwer Academic Publishers*, Dordrecht, The Netherlands, pp 1-33

- Bradford, Marion M. A. (1976) Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, v. 72, n. 1-2, p. 248-254.
- Cabral, V. O. S., D.S., (2009) Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. *Desenvolvimento da uva Niagara Rosada L. cultivada em clima tropical*.
- Camargo, U.A. (1998) *Cultivares para a viticultura tropical*. Informe Agropecuário, 19 (194): 15-1
- Camargo, U.A. (1994) *Uvas do Brasil*. Brasília: EMBRAPA-SPI, 90p. (Embrapa CNPUV. Documentos, 9)
- Candolfi-Vasconcelos, M.C., Candolfi, M.P., Koblet, W. (1994) Retranslocation of carbon reserves from the woody storage tissues into the fruit as a response to defoliation stress during the ripening period in *Vitis vinifera* L. *Planta*, 192: 567-573
- Carvalho, L. C., Vidigal P., Amâncio S. (2015) Oxidative stress homeostasis in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Frontiers in Environmental Science* 3: 20.
- Chao, W.S., Foley, M.E., Horvath, D.P., Anderson, J.V. (2007) Signals regulating dormancy in vegetative buds. *International Journal of Plant Developmental Biology*, Miki Cho, v.1, p.49-56.
- Conde, C., Silva, P., Fontes, N., Dias, A.C.P., Tavares, R.M., Sousa, M.J., Agasse, A., Delrot, S., Gerós, H. (2007) Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. *Food*, v.1, p.1-22.
- Coombe, B.G., McCarthy, M.G. (2000) Dynamics of berry growth and physiology of ripening. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 6:131-135.
- Currle, O., Bauer, O., Hofacker, W., Schumann, F., Frisch, W. (1983) *Biologie der Rebe. Neustadt an der Weinstrasse*. Meiningen, Germany
- Davies, C., Robinson, S.P. (2000) Differential Screening Indicates a Dramatic Change in mRNA profiles during grape berry ripening. Cloning and characterization of cDNAs encoding putative cell wall and stress response proteins. *Plant Physiology*, 122: 803-812.
- Diamond, M., and McCabe, P. F. (2011) Mitochondrial regulation of plant programmed cell death. In *Plant Mitochondria*, Advances in Plant Biology 1, F. Kemden, ed., Verlag: Springer Publishing, pp. 439–465.
- Dreier, L.P., Hunte, J.J., Ruffner, H.P (1998) Invertase activity, grape berry development and cell compartmentation. *Plant Physiology Biochemistry*, 36 (12): 865-872.

- Fortes A.M., Agudelo-Romero P., Silva M.S., Ali K., Sousa L., Maltese F., Choi Y.H., Grimplet J., Martinez- Zapater J.M., Verpoorte R., Pais M.S. (2011) Transcript and metabolite analysis in Trincadeira cultivar reveals novel information regarding the dynamics of grape ripening. *BMC Plant Biol*, 11:14
- Fuentes, S., Sullivan, W., Tilbrook, J., Tyerman, S.D. (2010) A novel analysis of grapevine berry tissue demonstrates a variety-dependent correlation between tissue vitality and berry shrivel. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 16, 327-336.
- Gechev, T. S., Van Breusegem, F., Stone, J. M., Denev, I., Laloi, C. (2006) Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *Bioessays* 28, 1091–1101
- Gerlier, D., & Thomasset, N. (1986) Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *Journal of immunological methods*, 94(1-2), 57-63.
- Gerrath, J.M. (1992) Developmental morphology and anatomy of grape flowers. *Horticultural Reviews*, New York, v.13, p.315-337.
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*, 48(12), 909-930.
- Giovannoni J. (2001) Molecular biology of fruit maturation and ripening. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52:725-749.
- Giribaldi M., Perugini I., Sauvage F-X., Schubert A. (2007) Analysis of protein changes during grape berry ripening by 2-DE and MALDI-TOF. *Proteomics*, 7:3154–3170.
- Green D.R., Reed J.C. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science*; 281:1309–12.
- Greenberg, J.T. (1996) Programmed cell death: a way of life for plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93:12094-12097.
- Hardie, W. J. (2000) Grapevine biology and adaptation to viticulture. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 6(2), 74-81.
- Hayes, M.A., Davies, C., Dry, I.B. (2007) Isolation, functional characterization, and expression analysis of grapevine (*Vitis vinifera* L.) hexose transporters: differential roles in sink and source tissues. *Journal of Experimental Botany*, 58 (8):1985–1997

- Heo, D. S., Park, J. G., Hata, K., Day, R., Herberman, R. B., Whiteside, T. L. (1990) Evaluation of tetrazolium-based semiautomatic colorimetric assay for measurement of human antitumor cytotoxicity. *Cancer Research*, 50(12), 3681-3690.
- Hidalgo, L. (1993) *Tratado de viticultura general*. Madrid: Mundi-prensa. p. 983
- Hidalgo, L. (2002) *Tratado de viticultura general*. 3. ed. Madrid: Mundi-prensa. 1235p.
- Hrazdina, G., Parsons, G.F., Mattick, L.R. (1984) Physiological and biochemical events during development and ripening of grape berries. *American Journal of Enology and Viticulture*, 35:220-227
- Huang R., Xia R., Hu L., Wang M. (2007) Antioxidant activity and oxygen scavenging system in orange pulp during fruit ripening and maturation. *Scientia Horticulturae* 113: 166-172
- Iannone, M.F., Rosales, E.P., Groppa, M.D., Benavides, M.P. (2010) Reactive oxygen species formation and cell death in catalase-deficient tobacco leaf disks exposed to cadmium. *Protoplasma*, 245(1-4), pp.15-27.
- Iland, P., Dry, P., Proffitt, T., Tyerman, S. (2011) The grapevine: from the science to the practice of growing wines for wine. 1<sup>a</sup> ed. Adelaide: *Patrick Iland Wine Promotions*. 310p
- Jabs, T. (1999) Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. *Biochemical pharmacology*, v. 57, n. 3, p. 231-245.
- Jackson, R.S. (2008) *Wine science: principles and applications*. 3<sup>a</sup> ed. California: *Academic press*. 751p
- Jimenez, A., Creissen, G., Kular, B., Firmin, J., Robinson, S., Verhoeyen, M., Mullineaux, P. (2002) Changes in oxidative processes and components of the antioxidant system during tomato fruit ripening. *Planta*, 214(5), 751-758.
- Jones, K.H., Senft, J.A. (1985) An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 33:77-79.
- Karuppanapandian, T., Moon, J. C., Kim, C., Manoharan, K., Kim, W. (2011) Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Australian Journal of Crop Science*, 5(6), 709.
- Kennedy, J. (2002) Understanding grape berry development. *Practical Winery & Vineyard*. July/August. p. 1-5.

- Krasnow, M., Matthews, M.A., Shackel, K.A. (2008) Evidence for substantial maintenance of membrane integrity and cell viability in normally developing grape (*Vitis vinifera* L.) berries throughout development. *Journal of Experimental Botany*, 59:849-859.
- Kroemer G. (1997) Mitochondrial implication in apoptosis. Towards an endosymbiont hypothesis of apoptosis evolution. *Cell Death Differ.* 4:443–56.
- Kuhn, G.B.; Maia, J.D.G. (2001) Cultivo da Niágara Rosada em áreas tropicais do Brasil. Bento Gonçalves, RS: *Embrapa Uva e Vinho*. 72p
- Lang, A. Düring, H. (1991) Partitioning control by water potential gradient: Evidence for compartmentation breakdown in grape berries. *Journal of Experimental Botany*, 42:1117-1122
- Lang, A., Thorpe, M.R. (1989) Xylem, phloem and transpiration flows in a grape: application of a technique for measuring the volume of attached fruits to high resolution using Archimedes" principle. *Journal of Experimental Botany*, 40: 1069-1078.
- Leão, P.C.S.; Silva, E.E.G. (2003) Caracterização fenológica e requerimentos térmicos de variedades de uvas sem sementes no Vale do São Francisco. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v.25, n.3, p.379-382.
- Leão, P.C. de S. (2005) *Características da uva Thompson Seedless no Vale do São Francisco*. Embrapa Semiárido-Comunicado Técnico (INFOTECA-E).
- Lerin, J. (2016) *Propriedades hidráulicas em bagas em desenvolvimento de Vitis labrusca L. Cv. Niagara Rosada: relação entre vitalidade do mesocarpo e funcionalidade do xilema* / Joviana Lerin. – Campos dos Goytacazes, 2016. 70 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal. Campos dos Goytacazes.
- Lijavetzky D., Carbonell-Bejerano P., Grimplet J., Bravo G., Flores P., Fenoll J., Hellín P., Oliveros J.C., Martínez-Zapater J.M. (2012) Berry flesh and skin ripening features in *vitis vinifera* as assessed by transcriptional profiling. *PLoS One*, 7: e 3954
- Lin, J., Wang, Y., Wang, G. (2006) Salt stress-induced programmed cell death in tobacco protoplasts is mediated by reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition pore status. *Journal of plant physiology*, 163(7), 731-739.
- Loew O. (1990) A new enzyme of general occurrence in organisms, *Science*, vol. 11 (pg.701-702)

- López-Vidal, O., Camejo, D., Rivera-Cabrera, F., Konigsberg, M., Villa-Hernández, J. M., Mendoza-Espinoza, J. A., de León-Sánchez, F. D. (2016) Mitochondrial ascorbate–glutathione cycle and proteomic analysis of carbonylated proteins during tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit ripening. *Food chemistry*, 194, 1064-1072.
- Lund, S.T., Bohlmann, J. (2006) The molecular basis for wine grape quality - A volatile subject. *Science*, 311 (5762):804-805.
- Maia, J. D. G.; Camargo, U. A. (2002) Implantação do vinhedo e manejo das plantas. In: Maia, J. D. G.; Kuhn, G. B. (Ed.) Cultivo da Niagara Rosada em regiões tropicais do Brasil. Bento Gonçalves: Embrapa-SPI; Embrapa-CNPUV. p. 11.
- Manica, I.; Pommer, C.V. (2006) *Uva do plantio a produção, pós-colheita e mercado*. Porto Alegre: Ed. Cinco Continentes. 185p.
- Miller G., Suzuki N., Ciftci-Yilmaz S., Mittler R. (2010) Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses, *Plant, Cell and Environment*, vol. 33 (pg. 453-467)
- Miolo, A., Miele, A. (2003) *O sabor do vinho*. Bento Gonçalves: Vinícola: Embrapa Uva e Vinho, 133p.
- Moller, I. M. (2001) Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual review of plant biology*, 52(1), 561-591.
- Mondal, K., Sharma, N. S., Malhotra, S. P., Dhawan, K., Singh, R. (2004) Antioxidant systems in ripening tomato fruits. *Biologia Plantarum*, 48(1), 49-53.
- Moraes, André Luís de (2003) Produção da videira 'Niagara Rosada' em função da desfolha após a colheita / André Luís de Moraes. Piracicaba. 50 p.
- Morrison, J.C. (1991) Bud development in *Vitis vinifera* L. *Botanical Gazette*, 152(3):304-315.
- McCarthy, M. G., Coombe, B. G. (1999) Is weight loss in ripening grape berries cv. Shiraz caused by impeded phloem transport? *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 5(1), 17-21.
- Mullins, M.G., Bouquet, A., Williams, L.E., (1992) *Biology of the Grapevine*. Cambridge University Press, Cambridge, UK
- Mullins, M.G., Bouquet, A., Williams, L.E. (1994) *Biology of the grapevine*. New York: University of Cambridge. 239p

- Negri A.S., Prinsi B., Rossoni M., Failla O., Scienza A., Cocucci M., Espen L. (2008) Proteome changes in the skin of the grape cultivar Barbera among different stages of ripening. *BMC Genomics*, 9:378.
- Neis, S., Reis, E.F., Santos, S.C. (2010) Produção e qualidade da videira cv. Niágara Rosada em diferentes épocas de poda no sudoeste goiano. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 32, n. 4, Dec.
- Niu, L., Liao, W. (2016) Hydrogen peroxide signaling in plant development and abiotic responses: crosstalk with nitric oxide and calcium. *Frontiers in plant science*, 7, 230.
- Noodén L. (2004) The senescence syndrome. In 'Plant cell death processes'. (Ed. L Noodén) pp. 10-13. (*Academic Press: Boston*)
- Ophir, R., Pang, X., Halaly, T., Venkateswari, J., Lavee, S., Galbraith, D., Or, E. (2009) Gene-expression profiling of grape bud response to two alternative dormancy-release stimuli expose possible links between impaired mitochondrial activity, hypoxia, ethylene-ABA interplay and cell enlargement. *Plant Molecular Biology*, 71(4-5), 403-423.
- Oracz, K., El-Maarouf-Bouteau, H., Kranner, I., Bogatek, R., Corbineau, F., Bailly, C. (2009) The mechanisms involved in seed dormancy alleviation by hydrogen cyanide unravel the role of reactive oxygen species as key factors of cellular signaling during germination. *Plant Physiology*, 150(1), 494-505.
- Perez peña, J.E. (2004) Whole-canopy photosynthesis and transpiration under regulated deficit irrigation in *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon. *PhD Thesis, Washington State University*. 234p.
- Petit, P. X., Susin, S. A., Zamzami, N., Mignotte, B., Kroemer, G. (1996) Mitochondria and programmed cell death: back to the future. *FEBS letters*, 396(1), 7-13.
- Petrov, V. D., Van Breusegem, F. (2012) Hydrogen peroxide—a central hub for information flow in plant cells. *AoB plants*, 2012.
- Pilati, S., Perazzolli, M., Malossini, A., Cestaro, A., Demattè, L., Fontana, P., Moser, C. (2007) Genome-wide transcriptional analysis of grapevine berry ripening reveals a set of genes similarly modulated during three seasons and the occurrence of an oxidative burst at *veraison*. *BMC genomics*, 8(1), 428.
- Pilati, S., Brazzale, D., Guella, G., Milli, A., Ruberti, C., Biasioli, F., Moser, C. (2014) The onset of grapevine berry ripening is characterized by ROS accumulation and

- lipoxygenase-mediated membrane peroxidation in the skin. *BMC plant biology*, 14(1), 87.
- Pommer, C.V. (2003) *Uva: tecnologia de produção, pós-colheita, mercado*. Porto Alegre: Cinco Continentes, 778 p.
- Pommer, C.V. (2006) Double cropping of table grapes in Brazil. *Chronica Horticulturae*, Leuven, 46(2), pp.22-25.
- Possner, D.R.E., Kliewer, W.M. (1985) The localization of acids, sugars, potassium and calcium in developing grape berries. *Vitis*, v.24, p.229-240.
- Pratelli, R., Lacombe, B., Torregrosa, L., Gaymard, F., Romieu, C., Thibaud, J., Sentenac, H. (2002) A Grapevine gene encoding a guard cell K<sup>+</sup> channel displays developmental regulation in the grapevine berry. *Plant Physiology*, 128 :564–577.
- Protas, J.F.S, Camargo, U.A., Mello, L.M.R. (2002) *A vitivinicultura brasileira: Realidade e perspectivas*. EMBRAPA Uva e Vinho, Artigo Técnico.
- Qin G., Wang Q., Liu J., Li B., Tian S. (2009) Proteomic analysis of changes in mitochondrial protein expression during fruit senescence. *Proteomics* 9:4241–4253
- Queval, G., Hager, J., Gakière, B., Noctor, G. (2008) Why are literature data for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> contents so variable? A discussion of potential difficulties in the quantitative assay of leaf extracts. *Journal of Experimental Botany*, 59(2), 135-146.
- Reynier, A. (2003) *Manual de viticultura*. 6. ed. Madrid: Mundi-Prensa. 497p
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A. (2003) *Tratado de enología*: 1. Microbiología Del vino vinificaciones. Hemisferio Sur, 665p.
- Rogiers, S. Y., Kumar, G. M., Knowles, N. R. (1998) Maturation and ripening of fruit of *Amelanchier alnifolia* Nutt. are accompanied by increasing oxidative stress. *Annals of Botany*, 81(2), 203-211.
- Sadras, V. O., McCarthy, M. G. (2007) Quantifying the dynamics of sugar concentration in berries of *Vitis vinifera* cv. Shiraz: a novel approach based on allometric analysis. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 13(2), 66-71.
- Scandalios J.G. (1987) The antioxidant enzyme genes cat and sod of maize: regulation, functional significance, and molecular biology. In MC Rattazzi, JG Scandalios, GS Whitt, eds, *Isozymes: Current Topics in Biological and Medical Research*, Vol 14: *Molecular and Cellular Biology*. Alan R Liss, New York, pp 19-44
- Scandalios, J. G. (1993) Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant physiology*, 101(1), 7.



- Serra, R.M.A. (2005) Microflora das uvas portuguesas e seu potencial para a contaminação das uvas com micotoxinas, com destaque para a ocratoxina A. 2005. 330 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) – Universidade do Minho, Escola de Engenharia, Braga.
- Slesak, I., Libik, M., Karpinska, B., Karpinski, S., Miszalski, Z. (2007) The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses. *Acta Biochimica Polonica-English Edition*, 54(1), 39.
- Sousa, J.S.I. (1996) *Uvas para o Brasil*. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz – FEALQ. 791p.
- Souza, G. M., (2013) D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. *Desenvolvimento e morfologia de inflorescências em videira “Niagara Rosada” (Vitis labrusca L.)*.
- Srinivasan, C., Mullins, M.G. (1981) Physiology of flowering in the grapevine - A review. *American Journal of Enology and Viticulture*, Davis, v.32, n.1, p.47-63,
- Taiz, L. e E. Zeiger. *Fisiologia e desenvolvimento vegetal*. Artmed Editora, 2017.
- Tattersall, D.B., Van Heeswijck, R., Hoj, P.B. (1997) Identification and characterization of a fruit-specific, thaumatin-like protein that accumulates at very high levels in conjunction with the onset of sugar accumulation and berry softening in grapes. *Plant Physiology*, v.114, p.759 –769.
- Terra, M.M.; Pires, E.J.P.; Pommer, C.V. (1997) *Tecnologia para produção de uva Itália na região noroeste do estado de São Paulo*. Campinas: CATI. 58p. (CATI. Documento Técnico, 97)
- Thomas, H., Huang, L., Young, M., Ougham, H. (2009) Evolution of plant senescence. *BMC Evolutionary Biology*,9:163
- Tilbrook, J., Tyerman, S.D. (2008) Cell death in grape berries: varietal differences linked to xylem pressure and berry weight loss. *Functional Plant Biology*, 35:173-184.
- Tilbrook, J., Tyerman, S.D. (2009) Hydraulic connection of grape berries to the vine: varietal differences in water conductance into and out of berries, and potential for backflow. *Functional Plant Biology*, 36 (6):541-550
- Tyerman, S.D., Tilbrook, J., Pardo, C., Kotula, L., Sullivan. W., Steudle, E. (2004) Direct measurement of hydraulic properties in developing berries of *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz and Chardonnay. *Australian Journal of Grape and Wine Research*,10:170-181.

- Tyerman, S.D., Fuentes, S., Collins, C. and Bastian, S. (2012) Is the Shiraz berry the biggest loser?
- Van Breusegem, Frank; Dat, James F. (2006) Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant physiology*, v. 141, n. 2, p. 384-390.
- Willekens H., Inzé D., Van Montagu M., Van Camp W. (1995) Catalases in plants. *Mol Breed* 1:207–228
- Winkler, A.J., Cook, J.A., Kliwer, W.M., Lider, L.A. (1997) *General Viticulture*. Ed. University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London, 710 p.
- Xi, F. F., Guo, L. L., Yu, Y. H., Wang, Y., Li, Q., Zhao, H. L., Guo, D. L. (2017) Comparison of reactive oxygen species metabolism during grape berry development between ‘Kyoho’ and its early ripening bud mutant ‘Fengzao’. *Plant Physiology and Biochemistry*, 118, 634-642.
- Ye, Z., Rodriguez, R., Tran, A., Hoang, H., de los Santos, D., Brown, S., Vellanoweth, R. L. (2000) The developmental transition to flowering represses ascorbate peroxidase activity and induces enzymatic lipid peroxidation in leaf tissue in *Arabidopsis thaliana*. *Plant science*, 158(1-2), 115-127.
- Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Decaudin, D., Macho, A., Hirsch, T., Kroemer, G. (1995) Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *Journal of Experimental Medicine*, 182(2), 367-377.
- Zhang, D.-P & Li, M., Wang, Y. (1997) Ultrastructural changes in the mesocarp cells of grape berry during its development. *Acta Botanica Sinica*. 39. 389-396.
- Zhang, J., Huang, W., Pan, Q., Liu, Y. (2005) Improvement of chilling tolerance and accumulation of heat shock proteins in grape berries (*Vitis vinifera* cv. Jingxiu) by heat pretreatment. *Postharvest biology and technology*, 38(1), 80-90.
- Zhaosen, X., Forney, C.F., Hongmei, C., Li, B. (2014) Changes in water translocation in the vascular tissue of grape during fruit development. *Pakistan Journal of Botany*, 46(2):483-488.